



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C07K 16/40, 16/18, C12P 21/08, C12N 15/06, 15/13, 5/20, 9/99, A61K 39/395 // (C12P 21/08, C12R 1:91)</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO96/20959 (43) 国際公開日 1996年7月11日 (11.07.96)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP95/02714 (22) 国際出願日 1995年12月27日 (27.12.95) (30) 優先権データ 特願平6/340006 1994年12月29日 (29.12.94) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 山之内製薬株式会社 (YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP] 〒103 東京都中央区日本橋本町2丁目3番11号 Tokyo, (JP) (72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 河内康司 (KAWAUCHI, Yasushi) [JP/JP] 〒305 茨城県つくば市春日二丁目35番2号-301 Ibaraki, (JP) 高崎 淳 (TAKASAKI, Jun) [JP/JP] 〒300 茨城県土浦市東崎町13番地2-B301 Ibaraki, (JP) 安永知栄 (YASUNAGA, Tomoe) [JP/JP] 〒305 茨城県つくば市松代三丁目7番17号-502 Ibaraki, (JP) 増保安彦 (MASUHO, Yasuhiko) [JP/JP] 〒184 東京都小金井市東町五丁目19番15号 Tokyo, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 弁理士 長井省三, 外 (NAGAI, Shozo et al.) 〒174 東京都板橋区小豆沢1丁目1番8号 山之内製薬株式会社 特許情報部内 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AM, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, US, UZ, VN, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (KE, LS, MW, SD, SZ, UG). 添付公開書類 国際調査報告書</p>

(54) Title: NOVEL MONOCLONAL ANTIBODY HAVING INHIBITORY EFFECT ON TYPE II PHOSPHOLIPASE A2 AND PROTEIN CONTAINING A PART OF THE SAME

(54) 発明の名称 II型ホスホリパーゼA2阻害作用を持つ新規なモノクローナル抗体及びその一部分を含むタンパク質

(57) Abstract

A novel monoclonal antibody inhibiting the activity of type II phospholipase A2. The antibody inhibits the activity of human type II phospholipase A2 and those of ape type II phospholipase A2 and/or mouse type II phospholipase A2, which makes it not only clinically useful but also usable as such in preclinical tests with the use of ape or mouse. The antibody, which has a completely novel characteristic of releasing type II phospholipase A2 bound to cell membrane, seems to strongly inhibit the type II phospholipase A2 activity via a novel mechanism. A protein containing the monoclonal antibody or a part of the same and being usable as a remedy for heart infarction, brain infarction, etc. in which type II phospholipase A2 participates.

II型ホスホリパーゼA2活性を阻害する新規なモノクローナル抗体を取得した。該抗体は、ヒトII型ホスホリパーゼA2の活性を阻害し、かつサルII型ホスホリパーゼA2及び／またはマウスII型ホスホリパーゼA2の活性を阻害することができるので、臨床上有用であるのみならず、サルまたはマウスを用いた前臨床試験にもそのまま利用できる。更に、該抗体は、細胞膜に結合したII型ホスホリパーゼA2を遊離するという全く新規な性質を有するものであり、II型ホスホリパーゼA2の活性を新規な機構で強力に阻害すると考えられる。本発明のモノクローナル抗体または該抗体の一部を含むタンパク質は、II型ホスホリパーゼA2をが関与する心筋梗塞、脳梗塞その他の治療薬として利用可能である。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PT	ポルトガル
AM	アルメニア	DK	デンマーク	LC	セントルシア	RO	ルーマニア
AT	オーストリア	EE	エストニア	LR	レソト	RU	ロシア連邦
AU	オーストラリア	ES	スペイン	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
AZ	アゼルバイジャン	FI	フィンランド	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	FR	フランス	LV	ラトヴィア	SI	スロベニア
BB	バルバドス	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロヴァキア
BE	ベルギー	GE	グルジア	MD	モルドヴァ共和国	SN	セネガル
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BJ	ベナン	GU	グアム	MK	マケドニア共和国	TD	チャド
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	ML	マリ	TG	トーゴ
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	TJ	タジキスタン
CA	カナダ	IL	イスラエル	MN	モンゴル	TM	トルクメニスタン
CC	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	MX	メキシコ	TR	トルコ
CG	コンゴ	JP	日本	MY	マレーシア	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	KE	ケニア	NE	ニジェール	UA	ウクライナ
CI	コート・ジボワール	KR	韓国	NL	オランダ	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NO	ノルウェー	US	アメリカ合衆国
CN	中国	RU	ロシア連邦			UZ	ウズベキスタン



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C07K 16/40, 16/18, C12P 21/08, C12N 15/06, 15/13, 5/20, 9/99, A61K 39/395 // (C12P 21/08, C12R 1:91)	A1	(11) 国際公開番号 WO96/20959 (43) 国際公開日 1996年7月11日 (11.07.96)
(21) 国際出願番号 (22) 国際出願日 PCT/JP95/02714 1995年12月27日 (27.12.95) (30) 優先権データ 特願平6/340006 1994年12月29日 (29.12.94) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 山之内製薬株式会社 (YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.)[JP/JP] 〒103 東京都中央区日本橋本町2丁目3番11号 Tokyo, (JP) (72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 河内康司(KAWAUCHI, Yasushi)[JP/JP] 〒305 茨城県つくば市春日二丁目35番2号-301 Ibaraki, (JP) 高崎 淳(TAKASAKI, Jun)[JP/JP] 〒300 茨城県土浦市東崎町13番地2-B301 Ibaraki, (JP) 安永知栄(YASUNAGA, Tomoe)[JP/JP] 〒305 茨城県つくば市松代三丁目7番17号-502 Ibaraki, (JP) 増保安彦(MASUHO, Yasuhiko)[JP/JP] 〒184 東京都小金井市東町五丁目19番15号 Tokyo, (JP)		(74) 代理人 弁理士 長井省三, 外(NAGAI, Shozo et al.) 〒174 東京都板橋区小豆沢1丁目1番8号 山之内製薬株式会社 特許情報部内 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AM, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, US, UZ, VN, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許(KE, LS, MW, SD, SZ, UG). 添付公開書類 国際調査報告書

(54) Title : NOVEL MONOCLONAL ANTIBODY HAVING INHIBITORY EFFECT ON TYPE II PHOSPHOLIPASE A2 AND PROTEIN CONTAINING A PART OF THE SAME

(54) 発明の名称 II型ホスホリパーゼA2阻害作用を持つ新規なモノクローナル抗体及びその一部分を含むタンパク質

(57) Abstract

A novel monoclonal antibody inhibiting the activity of type II phospholipase A2. The antibody inhibits the activity of human type II phospholipase A2 and those of ape type II phospholipase A2 and/or mouse type II phospholipase A2, which makes it not only clinically useful but also usable as such in preclinical tests with the use of ape or mouse. The antibody, which has a completely novel characteristic of releasing type II phospholipase A2 bound to cell membrane, seems to strongly inhibit the type II phospholipase A2 activity via a novel mechanism. A protein containing the monoclonal antibody or a part of the same and being usable as a remedy for heart infarction, brain infarction, etc. in which type II phospholipase A2 participates.

II型ホスホリパーゼA2活性を阻害する新規なモノクローナル抗体を取得した。該抗体は、ヒトII型ホスホリパーゼA2の活性を阻害し、かつサルII型ホスホリパーゼA2及び／またはマウスII型ホスホリパーゼA2の活性を阻害することができるので、臨床上有用であるのみならず、サルまたはマウスを用いた前臨床試験にもそのまま利用できる。更に、該抗体は、細胞膜に結合したII型ホスホリパーゼA2を遊離するという全く新規な性質を有するものであり、II型ホスホリパーゼA2の活性を新規な機構で強力に阻害すると考えられる。本発明のモノクローナル抗体または該抗体の一部を含むタンパク質は、II型ホスホリパーゼA2をが関与する心筋梗塞、脳梗塞その他の治療薬として利用可能である。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド
AM	アルメニア	DK	デンマーク	LC	セントルシア	PT	ポルトガル
AT	オーストリア	EE	エストニア	LK	スリランカ	PR	プエルトリコ
AU	オーストラリア	ES	スペイン	LR	リベリア	RO	ルーマニア
AZ	アゼルバイジャン	FI	フィンランド	LS	レソト	RU	ロシア連邦
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	FR	フランス	LT	リトアニア	SD	スーダン
BB	バルバドス	GB	ガボン	LU	ルクセンブルグ	SE	スウェーデン
BE	ベルギー	IE	アイルランド	LV	ラトヴィア	SG	シンガポール
BF	ブルキナ・ファソ	IG	ギニア	MC	モナコ	SI	スロベニア
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MD	モルドヴァ共和国	SK	スロバキア
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	SN	セネガル
BR	ブラジル	GU	グアム	MK	マケドニア共和国	SZ	スワジランド
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	ML	マリ	TD	チャド
CA	カナダ	IL	イスラエル	MR	モーリタニア	TG	トーゴ
CC	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MN	モンゴル	TJ	タジキスタン
CF	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	MW	モザンビーク	TM	トルクメニスタン
CG	コンゴ	JP	日本	MX	メキシコ	TR	トルコ
CH	スイス	KE	ケニア	NE	ニジェール	TT	トリニダード・トバゴ
CI	コート・ジボアール	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NL	オランダ	UA	ウクライナ
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NO	ノルウェー	UG	ウガンダ
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国			US	アメリカ合衆国
						UZ	ウズベキスタン

明細書

II型ホスホリパーゼA₂阻害作用を持つ新規なモノクローナル抗体 及びその一部分を含むタンパク質

技術分野

本発明はII型ホスホリパーゼA₂を強力に阻害する活性を有する新規なモノクローナル抗体、及びその一部分を含むタンパク質に関する。

更に詳しくは、本発明はII型ホスホリパーゼA₂に対する特異性、親和性に優れ、かつII型ホスホリパーゼA₂を強力に阻害し、II型ホスホリパーゼA₂を伴った疾患の治療薬としても利用可能な新規なモノクローナル抗体、及びその一部分を含むタンパク質に関する。また、本発明は、該モノクローナル抗体またはタンパク質を産生する細胞、該モノクローナル抗体またはタンパク質をコードするDNA及び該DNAを含む組換えベクターに関する。更に、本発明は、該モノクローナル抗体またはタンパク質を含む医薬組成物またはII型ホスホリパーゼA₂阻害剤に関する。

背景技術

ホスホリパーゼA₂は、生体膜構成成分の1,2-ジアシルホスホグリセリドのC2位のエステル結合を加水分解する酵素として知られる。この酵素は哺乳動物の種々の臓器や細胞に見られ、生体膜リン脂質の新生や代謝を司るのみならず、アラキドン酸カスケードの律速酵素としての役割があり、その代謝産物のプロスタグランジン、ロイコトリエン、トロンボキサンチン、PAF等はさまざまな生理活性をもつことが知られている。

ホスホリパーゼA₂には、I型、II型、細胞内等の種類が知られている（厚味厳

一ら、日本臨床、1994年特別号、202-206）。この中でも、II型ホスホリパーゼA2は、炎症反応に伴い、炎症局所の浸出液中に誘導されたり、多量の酵素が血中に放出される。さらにこの酵素は種々の炎症性疾患においてその病態の増悪化あるいはその原因の一部であることを示唆する種々の報告がある。例えば、Kikuchi-Yanoshitaらは、心筋梗塞のモデルであるラットの虚血性心疾患のモデルで臓器障害の進展と相応してこの酵素の活性が上昇していることを報告している（Kikuchi-Yanoshita, R. et al., J. Biochemistry, 114:33-38, 1993）。Leongらは、心筋梗塞の患者では血中に正常人より多量に本酵素が存在していることを報告している（Leong L.L. et al., Clinical Experimental Pharmacology and Physiology, 19 : 113-118, 1992）。

Lauritzenらは、脳梗塞の虚血再かん流障害において、病態の悪化に本酵素が主要な役割を果たしていることを示唆する報告をしている（Lauritzen I. et al., Brain Research, 651: 353-356, 1994）。Baurらは、急性腎不全において、病態の悪化に本酵素が主要な役割を果たしていることを示唆する報告をしている（Baur M., Klin Wochenschr, 67 : 196-202, 1989）。Murakamiらは、喘息等のアレルギー性疾患において中心的な役割を果たす、肥満細胞のヒスタミン顆粒放出をこの酵素が促進し、この酵素を阻害することにより喘息等のアレルギー性疾患の治療薬につながる可能性を示唆している（Murakami, M. et al., Journal of Immunology, 151: 5675-5684, 1993）。

SmithらおよびPrzanskiらは、慢性関節炎リウマチ患者では、その血中に正常人より多量に本酵素が存在することを報告し、その原因あるいはその増悪化を行っている可能性があることを示唆している（Smith G.M. et al., British Journal of Rheumatology, 31 : 175-178, 1992、Przanski W. et al., J. Rheumatology, 15 : 1351-1355, 1988）。Przanskiらは、同様に変形性関節症の患者浸出液中に正常人より多量に本酵素が存在することを報告し、その原因あるいはその増悪化を行っている可能性があることを示唆している（Przanski W. et al., Life

e Sciences, 48 : 2457-2462, 1991)。VadasらおよびGreenらは、敗血症ショックの患者では血中に正常人より多量に本酵素が存在することを報告し、その原因あるいはその増悪化を行っている可能性があることを示唆している (Vadas P. et al., Life Sciences, 50: 807-811, 1992, Green J., Inflammation, 15: 355-367, 1991)。

Nevalainenらは、肺炎患者で、特に重症な患者の血中に多量に本酵素が存在することを報告し、その原因あるいはその増悪化を行っている可能性があることを示唆している (Nevalainen T. J. et al., Gut, 34: 1133-1136, 1993)。Andersonらは、乾せん症の患者では皮膚中に多量に本酵素が存在することを報告し、その原因あるいはその増悪化を行っている可能性があることを示唆している (Anderson S. et al., Inflammation, 18 : 1-12, 1994)。

Koikeらは、多臓器疾患 (MOF) では、本酵素がこの疾患の原因の主要な役割を果たしていることを示唆する報告をしている (Koike K. et al., Surgery, 112: 173-180, 1992)。Koeniger ら、Edelson らおよびRomaschinらは、Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) の患者では血中に正常人より多量に本酵素が存在していることを報告し、その原因あるいはその増悪化を行っている可能性があることを示唆している (Koeniger R. et al., Klin Wochenschr, 67 : 212-216, 1989, Edelson J.D. et al., AM REV RESPIR DIS, 143 : 1102-1109, 1991, Romaschin A. et al., Clin. Biochem., 25 : 55-60, 1992)。

Minamiらは、クローン病および潰瘍性大腸炎の患者では血中に正常人より多量に本酵素が存在していることを報告し、その原因あるいはその増悪化を行っている可能性があることを示唆している (Minami T. et al., Gut, 33 : 914-921, 1992)。

この他、急性炎症前眼部炎症 (ぶどう膜炎)、新生児呼吸障害症候群 (RDS)、気管支肺異形成症 (BPD) などの疾患でも本酵素が関与していることが推察される。

ところで、抗ヒトII型ホスホリパーゼA₂抗体として、以下のものが知られて

いる。

Stonerらはヒト胎盤および滑液からヒトII型ホスホリパーゼA2酵素を精製し、これを免疫原とし、マウスを用い、モノクローナル抗体を取得している (Stoner C.R. et al., Journal of Immunological Methods, 145 : 127-136, 1991)。ここで用いた免疫方法は、BALB/cByJ系のマウスにフロインド完全アジュバントと混合したホスホリパーゼA2酵素5 μ gを先ず免疫し、さらに25日後3 μ gを免疫した。脾細胞の融合を行なう3日前 (免疫から36日後) 5 μ gを最終免疫している。従って、免疫した抗原の全量は13 μ gを3回に分けて、36日間に免疫している。脾細胞の融合はマウスミエローマ細胞PAI-0を用い、HAT培地で選択した。培地の上清をホスホリパーゼA2を用いたELISA系で調べモノクローナル抗体(PLA184、PLA185、PLA186、PLA187)を取得した。これらの抗体はヒトホスホリパーゼA2に対し酵素阻害活性はある。しかし、他種のホスホリパーゼA2に対する阻害活性を調べる実験はラットII型ホスホリパーゼA2に対してのみであり、これらの抗体は殆ど或いは全くラットII型ホスホリパーゼA2に対し交差反応性がなく、ラットの動物実験には用いることができないと報告している。

また、Takayamaらは、リウマチ患者の関節液からヒトII型ホスホリパーゼA2酵素を精製し、これを免疫原とし、マウスを用い、モノクローナル抗体を取得している。(Takayama K. et al., BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS 167: 1309-1315, 1990)。ここで用いた免疫方法は、ニトロセルロース膜にヒトII型ホスホリパーゼA2酵素10 μ gを吸着させた後ホモジナイズし、これをBALB/c系のマウスの脾内に接種した。2週間後、同じように免疫した。従って、免疫した抗原の全量は20 μ gを2回に分けて、28日間に免疫している。さらに3日後、マウスミエローマ細胞(X63-Ag8.6.5.3)と脾細胞の融合を行なっている。培地の上清をホスホリパーゼA2を用いたELISA系で調べ反応するモノクローナル抗体(HP-1、HP-2、HP-3、HP-4)を取得した。これらの抗体の中でヒトホスホリパーゼA2に対し酵素阻害活性が最も強いのがHP-1である。しかし、HP-1でもその阻害活

性は弱く、モル比で200倍の抗体を加えても、約80%の阻害活性しか示さない。

McCordらはリコンビナントヒトII型ホスホリパーゼA2酵素を精製し、これを免疫原とし、マウスを用い、モノクローナル抗体を取得している。(McCord M. et al., THE JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY 102:980-986, 1994)。ここで用いた免疫方法は、CAF1系マウスにフロインド完全アジュバントと混合したホスホリパーゼA2酵素100、50、25 μ gをおのおの4週間毎に免疫した。脾細胞の融合を行なう3日前に最終免疫をした。従って、免疫した抗原の全量は約200 μ gを4回に分けて、56日間に免疫している。脾細胞の融合はマウスミエローマ細胞SP2/0-AG14を用い、HAT培地で選択した。培地の上清をホスホリパーゼA2を用いた阻害活性を調べ、モノクローナル抗体(3F10)を取得した。この抗体1 μ gを用いヒトホスホリパーゼA2阻害活性を調べている。しかし、この論文の中ではどのくらいの量のヒトホスホリパーゼA2を用いたかの記載はなく阻害活性が強いのかどうか明確でない。

さらにジョンソン (Johnson L. K.) は、特許出願公表 (特表平4-506447号公報) においてリコンビナントヒトホスホリパーゼA2酵素を精製し、これを免疫原とし、ウサギを用い、ポリクローナル抗体を取得している。これは、モノクローナル抗体ではなく、しかも、免疫原として2種のペプチド (ヒトホスホリパーゼA2配列のセグメント「GTKFLSYKFSNSGSRITC (N末端から67位～85位)」及び「NKTTYNKKYQYYSNKHSRGSTPRC (N末端から109位～132位)」) を用い免疫をしている。この抗体を用いヒトホスホリパーゼA2阻害活性を調べている。しかし、本明細書の記載からは、どのくらいの量の抗体とヒトホスホリパーゼA2を用いたか不明であり、阻害活性が強いのかどうか明確でない。

また、特開平7-109300号においては、ヒトII型ホスホリパーゼA2と硫酸化多糖との結合を促進する抗体が開示されているが、該抗体がヒトII型ホスホリパーゼA2活性を阻害することは確認されていない。

更に、上述の従来公知の抗体においては、サル、マウス、ウサギ、ネコ、イヌ、

ラットのII型ホスホリパーゼA2に対する阻害活性について、または、細胞に結合したヒトホスホリパーゼA2を遊離するか否かについては知られていない。

マウスにヒトの酵素を免疫すると、マウスとヒトの酵素のアミノ酸配列の異なる部分に抗体はできやすい。従って、ヒトII型ホスホリパーゼA2をマウスに免疫するとヒトII型ホスホリパーゼA2に結合する抗体のほとんどはマウスII型ホスホリパーゼA2には結合しないと理論的に推定される。

また、II型ホスホリパーゼA2の酵素活性中心およびその近傍は一般に動物種間で保存されており、マウスとヒトでもかなりホモロジーが高い。ヒトII型ホスホリパーゼA2をマウスに免疫すると免疫学的なトレランスにより酵素活性中心およびその近傍部分を認識する抗体も得られ難い。従って、ヒトII型ホスホリパーゼA2を強く阻害する抗体も得られ難いのが現状である。

ヒトII型ホスホリパーゼA2を強く阻害し、しかもマウスII型ホスホリパーゼA2及び／またはサルII型ホスホリパーゼA2をも阻害する抗体は知られていない。新薬のヒトでの試験を行う場合、予め動物実験によってその薬効を明らかにせねばならない。従って、実験動物、特にマウスのような小動物およびサルで薬効を発揮するモノクローナル抗体、即ち、ヒトII型ホスホリパーゼA2を阻害するとともに、これら動物のII型ホスホリパーゼA2を強く阻害するモノクローナル抗体が必要である。

また、ホスホリパーゼA2酵素が膜リン脂質を加水分解する際、細胞に結合することが必須であることが知られている (Suga H. et al., Eur. J. Biochem., 218 : 807-813, 1993 / Murakami M. et al., J. Biol. Chem., 268: 839-844, 1993)。従って、血中あるいは浸出液中で遊離状態にある酵素を阻害するばかりでなく、その膜リン脂質が加水分解される細胞に結合したホスホリパーゼA2酵素を抗体がはずすことができれば、これらの抗体は新規な作用機序に基づくさらに強力なホスホリパーゼA2阻害効果を有することが期待される。しかも、細胞表面に結合したホスホリパーゼA2に抗体が結合すると、その細胞を補体及び／またはエフェク

ター細胞が攻撃し副作用をもたらすことが予想される。しかしながら、細胞に結合したホスホリパーゼA2をはずすことができる抗体も未だ得られていない。

従って、医薬品化を考慮したII型ホスホリパーゼA2に対する抗体において、ヒトII型ホスホリパーゼA2を強く阻害し、かつ他の動物種由来II型ホスホリパーゼA2をも阻害することができる抗体や、細胞に結合したII型ホスホリパーゼA2をもはずすことができる性状をもつ抗体を取得することが望まれていた。

発明の開示

本発明者らは、これらの問題点を克服するため鋭意研究を行い、以下の知見を得て発明を完成した。

即ち、リコンビナントヒトII型ホスホリパーゼA2をマウス一匹当たり20 μ gフロインド完全アジュバントと混合し2～3週間の間隔で計8回免疫した。このように、他の研究者と異なり、免疫の頻度を多く、しかも、免疫期間も長くすることにより、免疫学的なトレランスの回避を試みた。さらに、抗体をスクリーニングする際、ホスホリパーゼA2阻害活性に用いるアッセイ系についても工夫を行った。

即ち、ホスホリパーゼA2酵素活性で用いる基質として感度がよい大腸菌リン脂質を用い (Jacobson P. B. et al., Biochem. Pharm., 39: 1557, 1990)、さらに基質としての大腸菌リン脂質の調製についても工夫した。即ち、大腸菌リン脂質の調製はホスホリパーゼA2が欠損した大腸菌SN17(pldA, pla-2, thr-1, leuB6, thi) (Doi, O. et al., J. Biochem., 80: 1247-1258, 1976)を用い、トリチウムラベル化したオレイン酸を取り込ませ、調製した。この菌を用いることにより大腸菌ホスホリパーゼA2によるリン脂質の分解を受けなくなり効率良くトリチウムラベル化された比活性の高い大腸菌リン脂質が調製できた。さらに、酵素反応の反応時間を長くするなど従来法(J. Biol. Chem., 261: 4239-4246, 1986)より感度をできるだけあげたアッセイ系を用いることにより、効率良くしかも正確に目的の抗体産生ハイブリドーマをスクリーニングした。そして、各種の動物由来のII型ホ

スホリパーゼA2活性の阻害効果を調べた。

また、得られた抗体が細胞に結合したホスホリパーゼA2酵素を外すことができるかどうかを調べるアッセイ系を用い、抗体の新規な作用を調べた。

その結果、下記性質を持つことを特徴とするモノクローナル抗体の取得に成功した。

即ち本発明者らが取得したモノクローナル抗体は、ヒトII型ホスホリパーゼA2と反応性であり、強い阻害活性を持つ。また、サル、マウス血小板由来II型ホスホリパーゼA2と交差反応性を示し、強い阻害活性を持つ。従って、本発明の抗体を用いれば新薬のヒトでの試験を行う場合、予めサル、マウスでの動物実験を行うことができる。更に、本発明のモノクローナル抗体は、血中或いは浸出液中でさらに、血中あるいは浸出液中で遊離状態にある酵素を阻害するばかりでなく、細胞に結合したII型ホスホリパーゼA2酵素を抗体が外すことができる。II型ホスホリパーゼA2は細胞表面のヘパリン硫酸等を介して細胞に結合することから、ヘパリン硫酸などを細胞の表面に持つ、肝細胞、血管内皮細胞などに結合することが知られている。本発明のモノクローナル抗体は、血中或いは浸出液中で遊離状態にある酵素を阻害するばかりでなく、上述のような細胞に結合したII型ホスホリパーゼA2酵素を細胞膜から外すという性質も有している。

なお、本発明には、上記性質を有するモノクローナル抗体の一部分を含み、該モノクローナル抗体と同等の抗原結合能等を有するタンパク質も含まれる。また、該モノクローナル抗体と同等の抗原結合能等を有する限り、還元アルキル体や、動物を免疫して得たモノクローナル抗体のアミノ酸配列に対し、1又は複数個のアミノ酸を付加、欠失、置換、変異させたタンパク質も、本発明に含まれる。

更に、本発明者らは、本発明に含まれる抗体を産生する「ハイブリドーマ1.4」および「ハイブリドーマ10.1」から、抗体のH鎖及びL鎖可変領域をコードするcDNAを単離し、その全塩基配列を決定した。このことによって、遺伝子工学技術を利用した抗体の大量生産はもとより、抗体工学技術を利用して、

本発明に含まれる抗体を自由に改変することが容易に行えるようになった。

(「ハイブリドーマ1.4」について決定した塩基配列を配列番号1(L鎖)、配列番号3(H鎖)に示す。また、該塩基配列から予想されるアミノ酸配列を、配列番号2(L鎖)、配列番号4(H鎖)に示す。また、「ハイブリドーマ10.1」について決定した塩基配列を配列番号5(L鎖)、配列番号7(H鎖)に示す。また、該塩基配列から予想されるアミノ酸配列を、配列番号6(L鎖)、配列番号8(H鎖)に示す。)

即ち、本発明は、以下のものを含む。

- ① ヒト由来II型ホスホリパーゼA2の活性を阻害し、かつサル由来II型ホスホリパーゼA2及び／またはマウス由来II型ホスホリパーゼA2の活性を阻害することができるモノクローナル抗体、またはその一部分を含み該阻害能を有するタンパク質。
- ② 細胞膜に結合したII型ホスホリパーゼA2を遊離する作用を有するモノクローナル抗体、またはその一部分を含む該作用を有するタンパク質。
- ③ ホスホリパーゼA2がヒト由来である②記載のモノクローナル抗体またはタンパク質。
- ④ ヒト由来II型ホスホリパーゼA2の活性を阻害し、かつサル由来II型ホスホリパーゼA2及び／またはマウス由来II型ホスホリパーゼA2の活性を阻害することができ、かつ細胞膜に結合したII型ホスホリパーゼA2を遊離する作用を有するモノクローナル抗体、またはその一部分を含み該作用を有するタンパク質。
- ⑤ ハイブリドーマ12H5 (FERM BP-5300)、ハイブリドーマ1.4 (FERM BP-5297) またはハイブリドーマ10.1 (FERM BP-5298) のいずれかにより産生されるモノクローナル抗体もしくはその一部分を含むタンパク質、またはそれらと同等のII型ホスホリパーゼA2に対する作用を有するモノクローナル抗体もしくはその一部分を含むタンパク質。
- ⑥ 配列番号2、4、6または8のいずれかに示されるアミノ酸配列または該ア

ミノ酸配列に含まれる1つまたは複数のアミノ酸に対しアミノ酸の置換、欠失または挿入を行ったアミノ酸配列を有するタンパク質を含む、①または②に記載のモノクローナル抗体、またはその一部分を含むタンパク質。

⑦ 配列番号9～20のいずれかに示されるアミノ酸配列または該アミノ酸配列に含まれる1つまたは複数のアミノ酸に対しアミノ酸の置換、欠失または挿入を行ったアミノ酸配列を有するタンパク質を含む、①または②に記載のモノクローナル抗体、またはその一部分を含むタンパク質。

⑧ ①～⑦のいずれかに記載のモノクローナル抗体またはタンパク質を産生する細胞。

⑨ ハイブリドーマである⑧記載の細胞。

⑩ 組換えDNAによって形質転換された細胞である⑧記載の細胞。

⑪ ⑧記載の細胞を培養し、培養上清からモノクローナル抗体またはタンパク質を回収する工程を含む、①～⑦のいずれかに記載のモノクローナル抗体またはタンパク質を製造する方法。

⑫ ①～⑦のいずれかに記載のモノクローナル抗体またはタンパク質をコードするDNA。

⑬ 配列番号1、3、5または7のいずれかに示される塩基配列または該塩基配列に含まれる1つまたは複数の塩基に対し塩基の置換、欠失または挿入を行った塩基配列を含む、⑫に記載のDNA。

⑭ ⑫または⑬のDNAを含む組換えベクター。

⑮ ①～⑦のいずれかに記載のモノクローナル抗体またはタンパク質と薬剤学的に許容される担体とからなる医薬組成物。

⑯ ①～⑦のいずれかに記載のモノクローナル抗体またはタンパク質を含むII型ホスホリパーゼA2阻害剤。

なお、本発明でいう「タンパク質」は、アミノ酸数に特に限定はなく、アミノ酸の少ないいわゆる「ペプチド」も包含される。また、本発明でいう「モノクロ

一ナル抗体またはタンパク質を産生する細胞」は、本発明のモノクローナル抗体またはタンパク質を産生する限りにおいて、細菌、酵母、哺乳動物細胞などあらゆる細胞が含まれる。

本発明のモノクローナル抗体は、例えば、マウスハイブリドーマを培地またはマウスの腹水中で培養することにより生産される。また、その断片F(ab')₂、Fab、Fab'等は、例えば、産生された抗体をトリプシン、パパイン、ペプシンからなる群より選ばれたタンパク質分解酵素を用いて消化し、適切な精製を行うことによって得ることが可能である。

本発明のハイブリドーマ、例えばハイブリドーマ12H5、1.4、10.1は、免疫の頻度を多くかつ免疫期間を長くして、健常人II型ホスホリパーゼA2で感作したBALB/c系マウスの脾細胞とマウスの骨髓腫細胞P3×63Ag8/U1(P3U1)とを常法、例えばケーラーとミルスタインの細胞融合法により融合して得ることが可能である（後記実施例参照）。

なお、本発明者らによって取得され、本発明に含まれるマウスハイブリドーマ12H5、1.4、10.1は、それぞれ次の通り寄託されている。

ハイブリドーマ12H5に関する寄託：

(イ) 寄託機関の名称・あて名

名称：通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305）

(ロ) 寄託日（原寄託日） 平成6年11月22日

(ハ) 受託番号 生命研条寄第5300号（FERM BP-5300）

ハイブリドーマ1.4に関する寄託：

(イ) 寄託機関の名称・あて名

名称：通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305）

(ロ) 寄託日（原寄託日） 平成6年11月22日

(ハ) 受託番号 生命研条寄第5297号 (FERM BP-5297)

ハイブリドーマ10.1に関する寄託:

(イ) 寄託機関の名称・あて名

名称: 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

あて名: 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号 (郵便番号305)

(ロ) 寄託日 (原寄託日) 平成6年11月22日

(ハ) 受託番号 生命研条寄第5298号 (FERM BP-5298)

上記ハイブリドーマを培養する培地としては、例えば、ダルベッコ氏変法イーグル氏最少必須培地 (Dalbecco's modified minimum essential medium; 以下「DMEM」と略称する) にウシ胎仔血清、L-グルタミン、グルコース、ピルビン酸ナトリウム、2-メルカプトエタノール及び抗生物質 (例えばペニシリンG、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン等) を含有せしめた培地等が使われる。

ハイブリドーマの培養は通常、培地中で37℃にて5%二酸化炭素、95%空気の気相で2~4日間、或は2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン (例えばプリスタン、アルドリッチ社製) で前処置されたBALB/c系マウスの腹腔内にて10~20日間程度で行われ、精製可能な量の抗体が産生される。

また、本発明のモノクローナル抗体またはその一部分を含むタンパク質は、本発明の抗体をコードする遺伝子の全部または一部を発現ベクターに組み込み、大腸菌、酵母または動物細胞に導入して生産させることによっても得ることが可能である。

このように製造されたモノクローナル抗体は培養上清或は腹水からタンパク質の単離精製の常法により分離精製することができる。そのような方法としては例えば、遠心分離、透析、硫酸アンモニウムによる塩析、DEAE-セルロース、ハイドロキシルアパタイト、プロテイン-Aアガロース等によるカラムクロマトグラフィー等が挙げられる。

このように分離精製された抗体につき、常法により、ペプシン、パパイン等の

タンパク質分解酵素によって消化を行い、引続きタンパク質の単離精製の常法によって単離精製を行って活性ある一部分、例えばF(ab')₂、Fab、Fab'、Fvを得ることができる。さらにジチオスレイトール及びヨードアセトアミドなどを用いて常法による抗体のH鎖とH鎖および／またはH鎖とL鎖を結んでいるジスルフィド結合の還元アルキル化によって非共有結合のみでH鎖とL鎖が結びいた抗体の還元アルキル体を得ることができる（役に立つ免疫実験法 p 39 講談社サイエンティフィック）。

更に、本発明のモノクローナル抗体またはその一部分を含むタンパク質について、エフェクター活性を抑制するために、Fc部分のアミノ酸配列を変異させることも可能である（Duncan, A. R. et. al. Nature, 332 : 738, 1988 / Tao, M. et al., J. Exp. Med., 178 : 661-667, 1993 / Lund, J., J. Immunology, 147 : 2657, 1991）。また、他のタンパクをFc部分に置き換えることも可能である。さらには、他のタンパクをFc部分に融合し、新規な作用をもたせることも可能である。

なお、ヒトの治療に本発明のモノクローナル抗体または該抗体の一部を含むタンパク質を用いる場合は、ヒト由来の部分の割合が高いモノクローナル抗体または該抗体の一部を含むタンパク質を用いることが望ましい。そのようなモノクローナル抗体の例として、① 可変領域のみマウス等の動物由来のアミノ酸配列からなり、定常領域はヒト由来のアミノ酸配列からなる抗体、即ちいわゆる「キメラ抗体（chimeric antibody）」 ② 相補性決定領域（または超可変領域／以下「CDR」（complementarity-determining region）と略称）のみマウス等の動物由来のアミノ酸配列からなり、その他の領域はヒト由来のアミノ酸配列からなる抗体、即ちいわゆる「ヒト化抗体（humanized antibody）」が挙げられ、これらのタイプの抗体も本発明に含まれる。これらの「キメラ抗体」または「ヒト化抗体」は、例えば、本発明のハイブリドーマから、可変領域またはCDRに対応する遺伝子を単離して、ヒト抗体遺伝子と組み換え、宿主細胞に導入して発現させ

ることによって、当業者が容易に製造することが可能である (Int. J. Cancer, 44, 424~433(1989)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 8095~8099(1990)参照)。また、遺伝子は配列決定後、対応する配列を合成したものを用いることも、ハイブリドーマやヒト抗体産生細胞から得た遺伝子と合成した遺伝子を結合させて用いることもできる。また、可変領域またはCDRに対応する遺伝子としては、本発明者らが単離した、配列番号1、3、5または7いずれか記載の塩基配列またはそのCDR部分の塩基配列を含むDNAが最も好適であり、または配列番号2、4、6または8いずれか記載のアミノ酸配列またはそのCDR部分をコードする塩基配列を含むDNA、または該DNAの塩基配列の1つまたは複数の塩基に対し塩基の置換、欠失または挿入を行った塩基配列を有するDNA遺伝子またはその一部を有するDNAが好適に用いられる。なお、塩基の置換、欠失または挿入等の変異導入は、公知の方法で行うことができる (Gillam et al., Gene, 8, 81~97(1979)、Roberts et al., Nature, 328, 731~734(1987))。また、得られた変異塩基配列のうち好適な性質を有するアミノ酸配列をコードする配列を選択するには、ファージディスプレイ法を利用した方法 (Annu. Rev. Immunol., 12, 433-455(1994)) 等が用いられる。特に「ヒト化抗体」については、具体的には、公知の方法に従って、当業者が容易に製造することが可能である (Nature, 321, 522-525(1986); Science, 239, 1534-1536(1988); Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 86, 10029-10033(1989); Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 88, 2869-2873(1991))。なお、これらの文献等によれば、「ヒト化抗体」を製造する際、CDR部位のみヒト以外の生物のCDRと置換されるヒト抗体 (即ち「ヒト化抗体」の基本骨格を構成する抗体/「ヒト受容体抗体」と称する) として、該移植されるCDRが由来するヒト以外の生物の抗体とホモロジーの高いヒト抗体を用いることが好ましいとされている。実施例7に示すように、本発明者らが得た本発明に含まれるマウス抗体とホモロジーの高いヒト抗体は、例えば、Pag-1抗体 (Hughes-Jones, N. C. et. al. Biochem. J., 268, 135-140(1990))、WEA抗体 (Goni, F. et. al. Proc. Natl. Acad.

Sci. USA, 80, 4837-4841(1983))、I T H 5 - 2 抗体 (Chin, L. T., et al., Immunol. Letter, 44, 25-30(1995))、I T C 48 抗体 (Ohlin, M., et al., Mol. Immunol., 31, 983-991(1994)) であったので、これらの抗体が「ヒト化抗体」を作製する際の「ヒト受容体抗体」として好適であると考えられる。

また、「キメラ抗体」についても、公知の方法に従って、当業者が容易に製造することが可能である (Nature, 314, 268-270(1985):Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 84, 3439-3443(1987):Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 84, 214-218(1987), Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 81, 6851-6855(1984))。

本発明に含まれる好適なモノクローナル抗体またはタンパク質としては、ヒト II 型ホスホリパーゼ A2 で感作して上述のように作製したモノクローナル抗体 12H5 または 1.4 及びその断片 F(ab')₂、Fab、Fab' 等が挙げられる。また、これらのモノクローナル抗体またはその一部分の変換領域または超変換領域を有し、他の部分はヒト由来のモノクローナル抗体が挙げられる。

本発明の医薬組成物は、非経口投与、即ち、皮下、筋肉内または静脈内投与に特に有効である。非経口投与用組成物は、通常、投与可能な担体、好ましくは水性担体に溶解した、モノクローナル抗体またはその一部分を含むタンパク質の溶液からなる。種々の水性担体、例えば水、緩衝水、0.4%の食塩水、0.3%のグリシン、5%のグルコース、ヒトアルブミン溶液等を使用することができる。これらの溶液は無菌であり、そして一般的に粒子形成性物質を有していない。これらの組成物は、慣用で周知の滅菌技術によって滅菌することができる。これら組成物は、緩衝化剤、等張化剤等のような、生理的条件に近づけるのに必要な薬剤学的に許容される補助物、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム等を含有することができる。非経口的に投与できる組成物の実際の製造は、当該技術分野の熟練者に既知または周知の技術を用いて行うことが可能であり、例えば「Remington's Pharmaceutical Science, 第15版, Mack Publishing Company, ペンシルベニア州イース

トン(1980)」に記載されている。

本発明のモノクローナル抗体またはタンパク質または医薬組成物は、冷凍して貯蔵するか、凍結乾燥によって貯蔵し使用する前に適当な溶媒に溶解して再生して使用することができる。凍結乾燥及び再生は、当業者に既知の技術を用いることができる。

図面の簡単な説明

図1は、12H5、10.1および1.4のリコンビナントヒトII型ホスホリパーゼA2のエライザの結果を示す。

図2は、12H5、10.1および1.4のラット血小板由来ホスホリパーゼA2 活性に対するエライザの結果を示す。

図3は、12H5、10.1および1.4のリコンビナントヒトII型ホスホリパーゼA2活性に対する阻害作用を示す。

図4は、12H5、10.1および1.4のラットII型ホスホリパーゼA2活性に対する阻害作用を示す。

図5は、12H5の各種動物血小板由来ホスホリパーゼA2活性に対する阻害作用を示す。

図6は、10.1の各種動物血小板由来ホスホリパーゼA2活性に対する阻害作用を示す。

図7は、1.4の各種動物血小板由来ホスホリパーゼA2活性に対する阻害作用を示す。

図8は、12H5、10.1および1.4のBRL-3A細胞に結合したホスホリパーゼA2を遊離する作用を示す。

図9は、1.4のH鎖およびL鎖可変領域 cDNA のアンカードPCRクローニングの方法を示す。

図10は抗体1.4のL鎖の可変領域の cDNA 配列および翻訳されたアミノ酸配

列を示す。なお、CDR配列に対応すると予想される配列には下線が付されている。

図11は抗体1.4のH鎖の可変領域のcDNA配列および翻訳されたアミノ酸配列を示す。なお、CDR配列に対応すると予想される配列には下線が付されている。

図12は10.1のH鎖およびL鎖可変領域cDNAのPCRクローニングの方法を示す。

図13は抗体10.1のL鎖の可変領域のcDNA配列および翻訳されたアミノ酸配列を示す。なお、CDR配列に対応すると予想される配列には下線が付されている。

図14は抗体10.1のH鎖の可変領域のcDNA配列および翻訳されたアミノ酸配列を示す。なお、CDR配列に対応すると予想される配列には下線が付されている。

発明を実施するための最良の形態

以下に本発明の実施例を示すが、本発明はこれらの実施例に制限を受けるものではない。

(実施例1) ハイブリドーマ12.5、1.4、10.1の調製

a) リコンビナントヒトII型ホスホリパーゼA2の調製

本発明のモノクローナル抗体はリコンビナントヒトII型ホスホリパーゼA2を免疫することにより得られるが、リコンビナントヒトII型ホスホリパーゼA2のその調製はすべて特開平5-192167号公報記載の方法に準じて行った。

b) 免疫した脾細胞の調製

BALB/c系雄マウス（免疫開始時で6週齢）に、実施例1a)で精製したリコンビナントヒトII型ホスホリパーゼA2を一匹当たり20 μ g、0.1mlの生理的食塩水に溶解させたものについて同容量のフロイド完全アジュバントと混合し乳濁化させ、

腹腔内投与した（初回免疫）。以後2～3週間の間隔で7回、同量のホスホリパーゼA2を同容量のフロインド完全アジュバントと混合して乳濁化させたものでブースター投与を行った。第7回免疫の24日後、一匹当り20 μ gのホスホリパーゼA2を0.2mlの生理的食塩水に溶解させて、腹腔内投与した（最終免疫）。最終免疫の3日後に脾臓細胞を1匹のマウスから採取し、DMEM培地に懸濁させた。

c) ハイブリドーマ12H5、1.4、10.1の調製

上記で調製した脾細胞（ 1×10^6 個）をマウス骨髓腫細胞 P3 \times 63Ag8 \cdot U1(P3U1)（ 2×10^7 個）と、ケーラーとミルスタインの方法[Nature, 第256巻第495頁（1975年）参照]により融合した。即ち脾細胞とP3U1細胞をDMEMで数回洗浄した後、両者を50mlプラスチック製遠心管に入れ、充分混合した。次いで遠心分離して培地を除去し、これに37℃に保温した50%（w/v）ポリエチレングリコール（シグマ社製、平均分子量3350）を含むDMEM1mlを1分間を要して攪拌下徐々に加えた。

次に37℃に保温したDMEM10mlを滴下して細胞融合反応を終了させた。反応液を遠心分離し、上澄液を除去した後、HAT培地〔ヒポキサンチン（ 1×10^{-4} M）、アミノプテリン（ 4×10^{-7} M）、チミジン（ 1.6×10^{-5} M）を添加した10%ウシ胎仔血清を含むDMEM培地〕を残さに加え、脾細胞濃度が 6×10^5 細胞数 / mlになるようにした。この懸濁液を96穴プラスチック製プレートに、1穴当り200 μ l（脾細胞 1.2×10^5 個）ずつ分注した。11日後に培地の半量を吸引除去し、上記HAT培地を加えた。細胞融合の7～10日後約半数の穴の中に於てハイブリドーマの増殖がみられた。下記d)の方法で培養上清中の抗体活性を測定した。陽性のクローンは48穴プラスチック製プレートに移し、更に24穴プラスチック製プレートに移し、アミノプテリンをなくす以外は上述したものと同一培地で培養した。24穴プラスチック製プレート培養上清を用いて抗体活性の再現性をd)の方法で確認するとともに、e)の方法で酵素阻害活性を測定した。

酵素阻害活性を示した3つのクローンは、単クローン性を保証するために、限界希釈法によって、順次クローニングを行った。こうして得られたクローンによ

って産生されるモノクローナル抗体をそれぞれ12H5、1.4、10.1と命名した。

d) エライザ (ELISA) 法による抗体活性の測定

96穴平底マイクロタイタープレートの各ウェル（穴）に精製したリコンビナントヒトII型ホスホリパーゼA2を20mMトリス緩衝食塩水（TBS、pH7.4）で0.05 μ g/mlに溶解し、100 μ lずつ添加し、湿潤室中で一晚4℃に保存した。そののち、溶液を捨て、1%BSAを含むTBSを200 μ lずつ添加し、37℃で1時間静置し、各ウェルの未吸着部分をブロックした。その後、0.05%ツィーン20（Tween 20商品名）を含むTBS（TBS-Tween）溶液で数回洗浄を行った。ハイブリドーマ培養上清或は腹水或は精製抗体標品を、0.2%BSAを含むTBS-Tween（BSA-TBS-Tween）溶液で希釈し、100 μ lずつ各ウェルに添加し、室温で2時間反応を行った。

先と同様にTBS-Tween溶液で洗浄後、BSA-TBS-Tween溶液で2000倍希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗マウス抗体（ザイメッド社製）を100 μ lずつ各ウェルに添加し、室温で2時間反応を行った。反応後、先と同様にTBS-Tween溶液で洗浄後、酵素基質として、0.006%過酸化水素水、並びに0.1mg/mlの3,3',5,5'-テトラメチルベンチジンを含む0.1M酢酸-クエン酸ナトリウム緩衝液（pH5.8）を100 μ lずつ添加し、室温で30分間静置した。静置後、3M硫酸を25 μ lずつ加え反応を停止し、450nmの吸光度を測定した。

e) ホスホリパーゼA2阻害活性の測定

抗体のホスホリパーゼA2に対する阻害活性の測定法はジャーナル オブ バイオロジカルケミストリー（Pepinsky, R. B. et. al., J. Biol. Chem., 261(9), 4239-4246(1986)）を若干改良し、以下の方法で測定した。

リコンビナントヒトII型ホスホリパーゼA2精製標品0.5ngと培養上清或は精製抗体標品を150mM 塩化ナトリウムと12.5 mMの塩化カルシウムおよび250 μ g/mlの牛血清アルブミンを含む125mMトリス塩酸緩衝液（pH8.0）100 μ l中で室温で2時間ブレインキュベーションを行った。次に、トリチウム標識オレイン酸を取り込ませた大腸菌SN17のオートクレイブ標品25 μ l（5万から10万cpm）を反応液に添加し、

37℃で30分間反応させた。反応は水中に移して、4規定塩酸を25 μ l添加して停止させた。反応停止後、40mg/mlの牛血清アルブミンを25 μ l加えて混合したのち氷中で30分間放置した。

その後、15000rpmで2分間遠心した上清の放射活性を測定した。得られた放射活性より陰性対照（ホスホリパーゼA2と抗体を含まないサンプルの放射活性）を減じた値をホスホリパーゼA2活性とした。抗体のホスホリパーゼA2活性に対する阻害率は陽性対照（ホスホリパーゼA2を含み抗体を伴わないサンプルのホスホリパーゼA2活性）のホスホリパーゼA2活性を基準に以下の計算に基づいて百分率で表した。

ホスホリパーゼA2活性阻害率 = $\{1 - (\text{ホスホリパーゼA2と培養上清或は精製抗体標品をインキュベーションしたときのホスホリパーゼA2活性}) / (\text{陽性対照のホスホリパーゼA2活性})\} \times 100$

なお、ホスホリパーゼA2活性の測定の際に基質として用いたトリチウム標識オレイン酸を取り込ませた大腸菌のオートクレイブ標品は特開平5-192167号公報8頁に記載の方法に準じて調製した。

（実施例2）モノクローナル抗体の産生と精製

a) モノクローナル抗体の産生

BALB/c系雄マウス、生後5～6週齢に2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン（プリスタン、シグマ社製）0.5mlを腹腔内注射した後、14～21日後に 5×10^6 個のハイブリドーマを生理的食塩水0.5mlに懸濁して腹腔内に接種した。10～20日後に産生された腹水を屠殺開腹したマウスより採取した。1匹のマウスより5～10mlのモノクローナル抗体含有腹水が得られた。

b) モノクローナル抗体の精製

この腹水につき遠心分離して不溶物除去後、等容量の飽和硫酸アンモニウム溶液を加え、氷上で一時間攪拌した。生じた沈澱を遠心分離し、少量の0.9%の塩化ナトリウムを含む0.1M磷酸緩衝溶液（pH7.4）に溶解し、一晚4℃にて100倍容の

同緩衝液に対して透析を行い、粗精製ガンマグロブリン画分を得た。この画分より、MAPS-IIマウスモノクローナル抗体精製キット（商標、バイオラッドラボラトリーズ社製）を利用してIgGを精製した。

即ち、ガンマグロブリン画分に同容量のバインディングバッファーを加え、混合した後、同じバインディングバッファーで充分平衡化した「Protein A -Sepharose CL4B（ファルマシア社製）」を充填したカラム（ゲルベッドボリューム20ml）にかけ、バインディングバッファー3カラム容量で洗浄した。ついでキットに含まれる溶出バッファー約3カラム容量でIgGを溶出した。溶出したIgGは、20mM トリス緩衝食塩水（pH7.4）等に対して透析し、これを抗体標品とした。通常腹水1ml当り5～10mgのIgGが得られた。

（実施例3） 抗体のサブクラスの決定

ハイブリドーマ培養上清を用いて、アマシャム製マウスモノクローナル抗体タイピング用キットによりIgGサブクラスを決定した。本法はエライザ法によるもので、各々12H5（IgG2a）、1.4（IgG2a）、10.1（IgG1）と決定した。

（実施例4） 抗体の交差反応性

a) ラットII型ホスホリパーゼA2の精製

ラットPRP（血小板濃厚血漿）に1/5容のACD液（65mMのクエン酸と85mMのクエン酸ナトリウムを含む2%（w / v）のブドウ糖液）を添加し、2500 x gで10分間遠心した。沈殿した血小板を1mlあたり 2×10^9 細胞になるようにACD/F10培地（1:5）（F10；Gibco社製）混液を加えて懸濁した後、2500 x gで10分間遠心した。さらに沈殿した血小板を1mlあたり 2×10^9 細胞になるようにF10培地で再懸濁したのちに、最終濃度が2mMおよび2.5unitになるように1Mの塩化カルシウム および2500unit / mlのトロンビンを経順次添加した。

添加後、37℃で5分間インキュベーションした後、4℃で3000 x gで15分間遠心した上清（ラット血小板トロンビン刺激上清）を回収し、この上清をその後の精製操作に供した。ホスホリパーゼA2の精製は特開平5-192167号公報の第12頁記載

の方法を若干改良して行った。すなわち、ラット血小板トロンビン刺激上清を予め0.1M酢酸緩衝液(pH6.0)で平衡化してある硫酸化セルロファイン(生化学工業社製)カラム(エコノカラム;カラムサイズ20ml;BIO-RAD社製)に通液した。カラムに洗浄液(0.5M塩化ナトリウムを含む0.1M酢酸緩衝液(pH6.0))を200ml通液して充分洗浄した後、溶出液(1.5M塩化ナトリウムを含む0.1M酢酸緩衝液(pH6.0))を30ml通液して得られた画分を硫酸化セルロファイン結合画分とした。つぎに、硫酸化セルロファイン結合画分をHPLCにて分画した。

カラムはCAPCELL PAK C18(4.6mmID x 25cm;資生堂製)、HPLCシステムはLC-4A(島津製作所製)を用いて、すべて1ml/分の流速で行った。硫酸化セルロファイン結合画分を通液した後、0.1%トリフルオロ酢酸を60分間通液した。その後、0.1%トリフルオロ酢酸存在下で、0~50%アセトニトリルのリニアグラジェントをかけてホスホリパーゼA2を溶出した。ホスホリパーゼA2のピークは約30%アセトニトリル付近に現れるのでこれを回収した。

回収した画分をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法および銀染色法を用いて検定したところホスホリパーゼA2が単一バンドとして検出されたので、これをラットII型ホスホリパーゼA2とした。

b) ヒト、サル、イヌ、ウサギ、ネコ、マウス血小板由来II型ホスホリパーゼA2の調製

各種動物血小板由来II型ホスホリパーゼA2の調製はジャーナル オブ バイオリジカルケミストリー(J. Biol. Chem., 264(10), 5768-5775(1989))のヒト血小板破碎液の調製法に準じて調製した。

すなわち、ヒト、アカゲザル、イヌ、ウサギ、マウス、ネコよりPRP(血小板濃厚血漿)を調製し、最終濃度2mMになるようにEDTAを添加した後に、2500 x gで10分間遠心をして細胞を回収した。細胞を120mMの塩化ナトリウムと2mMのEDTAを含む30mMトリス塩酸緩衝液(pH7.4)に懸濁し、再度2500 x gで10分間遠心をした。この操作を2回行った後、得られた細胞を1mlあたり 2×10^9 細胞になるよう

に120mM塩化ナトリウムと2mMのEDTAを含む30mMトリス塩酸緩衝液（pH7.4）で再懸濁して、液体窒素下で凍結した。

凍結した細胞懸濁液を融解し、同量の0.36規定の硫酸を添加して超音波破碎（BIOHC 7040 ULTRA SONIC PROCESSOR：セイコー社製；output 80, 15秒×6回）を行った。得られた細胞超音波破碎液を氷中に60分間放置した後、4℃で10000 x gで30分間遠心し上清を回収した。沈殿にはさらに遠心上清の1/3容の0.18規定の硫酸を添加して再懸濁後、氷中に60分間放置した。その後、4℃で10000 x gで30分間遠心し上清を回収した。両方の遠心上清を合わせて、200mMの塩化ナトリウムを含む50mM酢酸緩衝液（pH4.5）に対して一晚透析操作を行った。透析後、細胞破碎液を4℃で15000 x gで40分間遠心した上清を回収し、血小板由来ホスホリパーゼA2とした。

c) エライザ反応性

実施例2b)で得られた各種モノクローナル抗体精製品を用いて以下の実験を行った。

IgG標品をBSA- TBS- Tweenで10 μ g/mlとし、3倍希釈系列を作製した。実施例1d)に従ってエライザを行い、リコンビナントヒトII型ホスホリパーゼA2およびラットII型ホスホリパーゼA2に対する交差反応性を調べた。ラットII型ホスホリパーゼA2に対するELISAは、実施例1d)のリコンビナントヒトII型ホスホリパーゼA2をラットII型ホスホリパーゼA2に置き換えて行った。

結果を、横軸に抗体濃度、縦軸に450nmにおける吸光度をとり、図1～図2に示した。12H5、および1.4にはラットホスホリパーゼA2への交差反応性が認められたが、10.1には交差反応性は認められなかった。

d) 各種動物由来ホスホリパーゼA2に対する阻害活性

実施例2b)で得られた各種モノクローナル抗体精製品を用いて以下の実験を行った。

① リコンビナントヒトII型ホスホリパーゼA2に対する阻害活性

実施例 1 a)のリコンビナントヒトII型ホスホリパーゼA2を用い、実施例 1e)に従い、ホスホリパーゼA2に対する阻害活性を測定した。横軸にホスホリパーゼA2と抗体標品をプレインキュベーションしたときの抗体濃度をとって、各抗体のリコンビナントヒトII型ホスホリパーゼA2活性に対する阻害率を図3に示した。12H5および1.4は10 μ g / mlの濃度でホスホリパーゼA2活性をほぼ完全に阻害した。一方、10.1は3 μ g/mlの濃度で80%の阻害率に達した。

② ラットII型ホスホリパーゼA2に対する阻害活性

実施例 1e)のリコンビナントヒトII型ホスホリパーゼA2を実施例 4a)のラットII型ホスホリパーゼA2精製標品 (0.5ng) に置き換えて、ホスホリパーゼA2に対する阻害活性を測定した。横軸にホスホリパーゼA2と抗体標品をプレインキュベーションしたときの抗体濃度をとって、各抗体のラットII型ホスホリパーゼA2活性に対する阻害率を図4に示した。12H5および1.4はラットII型ホスホリパーゼA2の活性をも阻害し、ホスホリパーゼA2活性の50%を阻害するのに必要な抗体濃度は12H5で5 μ g/mlであった。

③ ヒト、サル、イヌ、ウサギ、ネコ、マウス、血小板由来II型ホスホリパーゼA2に対する阻害活性

実施例 1e)のリコンビナントヒトII型ホスホリパーゼA2を各血小板破碎液の一定量 (20から40 μ l) に置き換えて、ホスホリパーゼA2に対する阻害活性を測定した。横軸に血小板破碎液と抗体標品をプレインキュベーションしたときの抗体濃度をとって、各抗体の血小板由来ホスホリパーゼA2活性に対する阻害率を図5～図7に示した。12H5、1.4および10.1はヒト血小板由来のホスホリパーゼA2活性をリコンビナントヒトII型ホスホリパーゼA2活性と同様に阻害した。このことより本発明のリコンビナントヒトII型ホスホリパーゼA2に対する抗体は天然のヒトII型ホスホリパーゼA2の活性を阻害する能力を有していた。一方、本発明の抗体はアカゲザル、マウス血小板由来のホスホリパーゼA2活性を阻害した。また、イヌ血小板由来のホスホリパーゼA2活性の一部を阻害した。一方、ウサギ、ネコ血小

板由来のホスホリパーゼA2活性は阻害しなかった。

(実施例5) 抗体の細胞に結合したII型ホスホリパーゼA2を遊離する活性

肝細胞 (BRL-3A: 大日本製薬より購入) を96穴平板培養プレート (Falcon社製) でF12K / 10%FCS (F12K: 大日本製薬社製) を用いて培養した。コンフルエント迄培養した細胞の培養液を除き、4ngの ^{125}I で標識したリコンビナントヒトII型ホスホリパーゼA2を含むF12K/ 10%FCSを50 μl 添加し37 $^{\circ}\text{C}$ でインキュベーションし、ホスホリパーゼA2を細胞に結合させた。1時間後、精製抗体標品を含むF12K / 10%FCSまたはF12K/10%FCSを50 μl 添加し更に2時間インキュベーションした。インキュベーション後、培養液を回収し、その放射活性を測定した。同時に、反応系に添加した4ngの ^{125}I で標識したホスホリパーゼA2の放射活性を別途に測定した。

抗体の細胞からホスホリパーゼA2を遊離する活性は、添加したホスホリパーゼA2の放射活性から、ホスホリパーゼA2を細胞に結合後F12K / 10%FCSを添加しインキュベートしたときの培養液の放射活性を引いた値を100%として、添加した抗体濃度を変えインキュベーションしたときの培養液の放射活性を百分率で示した。

なお、リコンビナントヒトII型ホスホリパーゼA2の ^{125}I での標識は以下の方法で行った。IODOGEN (ピアス社製) 10 μg でコートしたガラス試験管に30 μg のリコンビナントヒトII型ホスホリパーゼA2を含む100mMのトリス塩酸緩衝液 (pH7.4) 100 μl を添加し、100mCi/mlの Na^{125}I (ICN社製) を6 μl 添加した後、20分間室温にて放置した。ガラス試験管より反応液を取り出すことで反応を停止した。未反応の Na^{125}I はゲル濾過法により除いた。

ホスホリパーゼA2を結合させた細胞に種々の濃度の精製抗体標品を添加してインキュベーションしたときの培養液の放射活性を測定した。横軸に抗体添加後の培養液中の抗体濃度をとって、各抗体の細胞に結合したホスホリパーゼA2を遊離する活性を図8に示した。コントロールのマウス抗体は細胞からホスホリパーゼA2をまったく遊離しないが、12H5、10.1および1.4は濃度依存的に細胞よりホスホ

リパーゼA2を遊離した。

(実施例6) 抗体のH鎖およびL鎖可変領域cDNAのクローニング

cDNAクローニングに用いたメッセンジャーRNAは「QuickPrep Micro mRNA Purification Kit (ファルマシア社製)」を使用して約10'個のハイブリドーマ細胞から作成した。すなわち細胞を抽出緩衝液 (Extraction buffer) で懸濁溶解し、オリゴdTセルロース (Oligo(dT)-Cellulose) を用いてmRNAを単離した。

抗体1.4のH鎖およびL鎖可変領域cDNAは「5' RACE System Kit (ギブコ社製)」を使用して図9に示す手順で作成した。すなわち、定常領域遺伝子 (C) とハイブリッド形成するプライマーおよび逆転写酵素 (SUPER SCRIPT II Reverse Transcriptase) を使用して1 μ gのメッセンジャーRNAを鋳型にして一本鎖cDNAを合成した。ここで使用したプライマーはL鎖では「GSP1L (5'-GGCACCTCCAGATGTTAACTGC-3') / 配列番号21」で、H鎖では「GSP1H (5'-GGAA(AG)TA(AGC)CCCTTGACCAGGC-3') / 配列番号22」であった。なお、GSP1Hの配列で括弧内の配列は、縮重に対応する塩基を示す。次に、鋳型となったmRNAをRNaseHにて消化した後、「GLASS MAX Spin Cartridge」にて一本鎖cDNAを精製した。dCTPおよび末端デオキシヌクレオチドトランスフェラーゼを使用して一本鎖cDNAの3'末端にポリ(dC)テールを結合させた。H鎖およびL鎖可変領域遺伝子 (V) はポリ(dC)テールとハイブリッド形成するアンカープライマー (5'-CUACUACUACUAGGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG-3' / 配列番号23) および定常領域遺伝子 (C) とハイブリッド形成するプライマー「GSP2L (5'-TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTGGTGC-3') / 配列番号24」(L鎖の場合) または「GSP2H (5'-TATAGAGCTCAAGCTTCCAGTGGATAGAC(CAT)GATGGGG(GC)TGT(TC)GTTTTGGC-3') / 配列番号25」(H鎖の場合) を用いてLATaq (宝酒造社製) を使用して増幅させた。GSP2Hの配列で括弧内の配列は、縮重に対応する塩基を示す。このPCR反応物を1.

2%アガロースゲル電気泳動にかけたところH鎖およびL鎖とも約550~570塩基対付近に単一バンドが検出できた。

また、抗体10.1のH鎖およびL鎖可変領域cDNAは「Marathon cDNA Amplification Kit (クロンテック社製)」を使用して図12の方法で作成した。すなわち、「Marathon cDNA合成プライマー」および逆転写酵素を使用して1 μ gのメッセンジャーRNAを鋳型にして一本鎖cDNAを合成した。この反応液にさらにRNaseH、DNAポリメラーゼI (DNA polymerase I)、DNAライゲース (DNA ligase) を反応させて二本鎖cDNAを合成した。さらに、この反応液にT4 DNAポリメラーゼ (T4 DNA polymerase) を反応させて二本鎖cDNAを平滑末端化した。T4 DNA ligaseを使用してMarathon cDNAアダプターを二本鎖cDNAに結合させた。H鎖およびL鎖可変領域遺伝子 (V) はアダプターとハイブリッド形成するアダプタープライマー1およびプライマーGSP2L (L鎖の場合) またはGSP2H (H鎖の場合) を用いてLA Taq (宝酒造社製) を使用して増幅させた。このPCR反応物を1.2%アガロースゲル電気泳動にかけたところH鎖およびL鎖とも約550~570塩基対付近に単一バンドが検出できた。

配列決定のため「TA cloning Kit (インビトロジェン社製)」を使用してpCRTM I1ベクターにPCRで増幅したフラグメントを組み込んだ。このフラグメントの挿入されたpCRTM I1プラスミドを、大腸菌JM109のコンピテントセル (宝酒造社製) にトランスフォーメーションした。プレート上にでてきたコロニーおよびpCRTM I1とハイブリッド形成する「5' プライマーUD (5'-ACC GAGCTCGGATCCACTAG-3') / 配列番号26」および「3' プライマーDU (5'-ATG CATGCTCGAGCGGCCGCC-3') / 配列番号27」を用い、Taqポリメラーゼ (宝酒造社製) を用いたコロニーPCRを行った。増幅したDNAフラグメントを1.2%アガロースゲル電気泳動により分析し、約600~620塩基対のフラグメントが増幅したコロニーを抗体1.4 L鎖については3クローン、H鎖については4クローン、また抗体10.1 L鎖については2クローン、H鎖については4クロー

ーンを選択した。各クローンの大腸菌を培養し「QIAwell-8 Plasmid Purification Kit (キアゲン社製)」を使用してプラスミドDNAを調製した。

調製した各クローンのプラスミドDNAおよびプライマーUD、プライマーDU、またはL鎖ではGSP2L、H鎖ではGSP2Hを用いて「DNA Sequencing Kit (パーキンエルマー社製)」を利用して配列決定反応を行い「373DNA Sequencer (ABI社製)」を用いて解析を行った。抗体1.4の3つのL鎖特異性および4つのH鎖特異性のクローン、および抗体10.1の2つのL鎖特異性および4つのH鎖特異性のクローンはそれぞれ配列が同一であった。図10 (配列番号1及び2) は抗体1.4のL鎖について、図11 (配列番号3及び4) は抗体1.4のH鎖について、それぞれ可変領域のcDNA配列および推定アミノ酸配列を示す。また、図13 (配列番号5及び6) は抗体10.1のL鎖について、図14 (配列番号7及び8) は抗体10.1のH鎖について、それぞれ可変領域のcDNA配列および推定アミノ酸配列を示す。なお、各図中、CDR配列に対応すると予想される配列には下線が付されている。(抗体1.4のL鎖の予想CDR配列は配列番号9～11、抗体1.4のH鎖の予想CDR配列は配列番号12～14、抗体10.1のL鎖の予想CDR配列は配列番号15～17、抗体10.1のH鎖の予想CDR配列は配列番号18～20にそれぞれ示されている。)

(実施例7) 抗体1.4および抗体10.1のH鎖およびL鎖可変領域アミノ酸配列のヒト抗体アミノ酸配列とのホモロジー検索

実施例6で得られた抗体1.4及び抗体10.1のH鎖およびL鎖可変領域のアミノ酸配列とホモロジーの高いヒト抗体をGenBank、EMBL、SWISS-PROT、PIR、PRFデータベースより検索した。ホモロジー検索はBLASTP 1.4.8MP (Altschul, S. F. et. al. J.Mol.Biol., 215, 403-410(1990)) プログラムで実施した。この結果、抗体1.4は、例えばPag-1抗体 (Hughes-Jones, N. C. et. al. Biochem.J., 268, 135-140(1990)) やWEA抗体 (Goni, F. et. al. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 80, 4837-4841(198

3)) 等と高いホモロジーを有していることが判明した。また、抗体 10.1 は例えば、I T H 5 - 2 抗体 (Chin, L. T., et al., Immunol. Letter, 44, 25-30(1995))、I T C 48 抗体 (Ohlin, M., et al., Mol. Immunol., 31, 983-991(1994)) 等と高いホモロジーを有していることが判明した。

産業上の利用の可能性

本発明のモノクローナル抗体及びその一部分を含むタンパク質は、ヒトII型ホスホリパーゼA2と反応性であり、強い阻害活性を持つ。また、サル及び／またはマウス血小板由来II型ホスホリパーゼA2と交差反応性を示すので、実験動物としてのこれらの動物にも適用可能であり、ヒトに対する薬理効果を試験するに先だって、予めサル、マウスでの動物実験を行うことができるという利点がある。また、本発明のモノクローナル抗体及びその一部分を含むタンパク質は、細胞に結合したII型ホスホリパーゼA2酵素をはずすことができるので、II型ホスホリパーゼA2酵素に対して特に強い阻害活性を有するし、補体及び／またはエフェクター細胞の攻撃による副作用が生じないと考えられる。

本発明のモノクローナル抗体及びその一部分を含むタンパク質は、ヒトII型ホスホリパーゼA2がその病態の増悪化あるいはその原因の一部であることを示唆する種々の疾患（心筋梗塞、脳梗塞、急性腎不全、喘息等のアレルギー性疾患、慢性関節炎リウマチ、変形性関節症、敗血症ショック、肺炎、乾せん症、多臓器疾患（MOF）、Acute Respiratory Distress Syndrome（ARDS）、クローン病および潰瘍性大腸炎、急性炎症前眼部炎症（ぶどう膜炎）、新生児呼吸障害症候群（RDS）、気管支肺異形成症（BPD）、その他）の治療薬として使用されうる。

ATG GAG ACA GAC ACA CTC CTG CTA TGG GTG CTG CTG CTC TGG GTT CCA	48
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro	
1 5 10 15	
GGT TCC ACA GGT GAC ATT GTG CTG ACC CAA TCT CCA GCT TCC TTG GCT	96
Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala	
20 25 30	
GTG TCT TTA GGG CAG AGG GCC ACC ATA TCC TGC AGA GCC AGT GAA AGT	144
Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser	
35 40 45	
GTT GAT AGT TAT GGC ATT AGT TTT ATG CAC TGG TAT CAG CAG AAA CCA	192
Val Asp Ser Tyr Gly Ile Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro	
50 55 60	

GGA CAG CCC CCC AAA CTC CTC ATT TAT CGT GCA TCC AAC CTA GAA TCT 240
 Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 65 70 75 80
 GGG ATC CCT GCC AGG TTT AGT GGC AGT GGG TCT AGG ACA GAA TTC ACC 288
 Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Glu Phe Thr
 85 90 95
 CTC ACC ATT AAT CCT GTG GAG GCT GAT GAT GTT GCA ACC TAT CAC TGT 336
 Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr His Cys
 100 105 110
 CAG CAA AGT AAT GAG GAT CCA TTC ACG TTC GGC TCG GGG ACA AAG TTG 384
 Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu
 115 120 125
 GAA ATA AAA 393
 Glu Ile Lys
 130

配列番号 : 2

配列の長さ : 131

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

起源

セルライン : 1.4

配 列

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1

5

10

15

Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
 20 25 30
 Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser
 35 40 45
 Val Asp Ser Tyr Gly Ile Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 50 55 60
 Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 65 70 75 80
 Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Glu Phe Thr
 85 90 95
 Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr His Cys
 100 105 110
 Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu
 115 120 125
 Glu Ile Lys
 130

配列番号 : 3

配列の長さ : 408

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

起源

セルライン : 1.4

配列の特徴

特徴を表す記号 : CDS

存在位置 : 1 .. 408

特徴を決定した方法 : E

配 列

ATG AGA GTG CTG ATT CTT TTG TGG CTG TTC ACA GCC TTT CCT GGT TTC	48
Met Arg Val Leu Ile Leu Leu Trp Leu Phe Thr Ala Phe Pro Gly Phe	
1 5 10 15	
CTG TCT GAT GTG CAG CTT CAG GAA TCG GGA CCT GGC CTG GTG AAA CCT	96
Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro	
20 25 30	
TCT CAA TCT CTG TCC CTC ACC TGC ATG GTC ACT GGC TAC TCA ATC ACC	144
Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Met Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr	
35 40 45	
AGT GAT TAT GCC TGG AAC TGG ATC CGG CAG TTT CCG GGA AAC AAA CTG	192
Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu	
50 55 60	
GAG CGG ATG GGA TAC ATA AGG TAC AGT GGT TAC ACT AGC TAC AAC CCA	240
Glu Arg Met Gly Tyr Ile Arg Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Asn Pro	
65 70 75 80	
TCT CTC AAA AGT CGA ATC TTT ATC ACG CGA GAC ACA TCC CAG AAC CAG	288
Ser Leu Lys Ser Arg Ile Phe Ile Thr Arg Asp Thr Ser Gln Asn Gln	
85 90 95	
TTC TTC CTA CAT TTG ACT TCT GTG ACT ACT GAG GAC ACA GCC ACA TAT	336
Phe Phe Leu His Leu Thr Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr	
100 105 110	

TAC TGT ACA AGA GAC TTG GAC GCC TGG TAC TTC GAT GTT TGG GGC GCA 384
 Tyr Cys Thr Arg Asp Leu Asp Ala Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala
 115 120 125
 GGG ACA ACG GTC ACC GTC TCC TCA 408
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135

配列番号 : 4

配列の長さ : 136

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

種類 : タンパク質

起源

セルライン : 1.4

配 列

Met Arg Val Leu Ile Leu Leu Trp Leu Phe Thr Ala Phe Pro Gly Phe
 1 5 10 15
 Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro
 20 25 30
 Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Met Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr
 35 40 45
 Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu
 50 55 60
 Glu Arg Met Gly Tyr Ile Arg Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Asn Pro
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Ser Arg Ile Phe Ile Thr Arg Asp Thr Ser Gln Asn Gln
 85 90 95
 Phe Phe Leu His Leu Thr Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
 100 105 110
 Tyr Cys Thr Arg Asp Leu Asp Ala Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala
 115 120 125
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135

配列番号 : 5

配列の長さ : 381

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

起源

セルライン : 10.1

配列の特徴

特徴を表す記号 : CDS

存在位置 : 1 .. 381

特徴を決定した方法 : E

配 列

ATG GAA TCA CAG ACT CTG GTC TTC ATA TCC ATA CTG CTC TGG TTA TAT 48
 Met Glu Ser Gln Thr Leu Val Phe Ile Ser Ile Leu Leu Trp Leu Tyr
 1 5 10 15

GGA GCT GAT GGG AAC ATT GTA ATG ACC CAA TCT CCC AAA TCC ATG TCC	96
Gly Ala Asp Gly Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser	
20 25 30	
ATG TCA GTA GGA GAG AGG GTC ACC TTG ACC TGC AAG GCC AGT GAG AAT	144
Met Ser Val Gly Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn	
35 40 45	
GTG GTT ACT TAT GTT TCC TGG TAT CAA CAG AAA CCA GAG CAG TCT CCT	192
Val Val Thr Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro	
50 55 60	
AAA CTG CTG ATA TAC GGG GCA TCC AAC CGG TAC ACT GGG GTC CCC GAT	240
Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp	
65 70 75 80	
CGC TTC ACA GGC AGT GGA TCT GCA ACA GAT TTC ACT CTG ACC ATC AGC	288
Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser	
85 90 95	
AGT GTG CAG GCT GAA GAC CTT GCA GAT TAT CAC TGT GGA CAG GGT TAC	336
Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Gly Tyr	
100 105 110	
AGC TAT CCG TAC ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA	381
Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
115 120 125	

配列番号 : 6

配列の長さ : 127

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

起源

セルライン : 10.1

配 列

Met Glu Ser Gln Thr Leu Val Phe Ile Ser Ile Leu Leu Trp Leu Tyr

1

5

10

15

Gly Ala Asp Gly Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser

20

25

30

Met Ser Val Gly Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn

35

40

45

Val Val Thr Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro

50

55

60

Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp

65

70

75

80

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

85

90

95

Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Gly Tyr

100

105

110

Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

115

120

125

配列番号 : 7

配列の長さ : 414

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

起源

セルライン : 10.1

配列の特徴

特徴を表す記号 : CDS

存在位置 : 1 , 414

特徴を決定した方法 : E

配列

ATG GCT GTC CTG GCA TTA CTT TTT TGC CTG GTA ACA TTC CCA AGC TGT	48
Met Ala Val Leu Ala Leu Leu Phe Cys Leu Val Thr Phe Pro Ser Cys	
1 5 10 15	
ATC CTT TCC CAG GTG CAG CTG AAG GAG TCA GGA CCT GGC CTG GTG GCG	96
Ile Leu Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala	
20 25 30	
CCC TCA CAG AGC CTG TCC ATC ACA TGT ACC GTC TCA GGG TTC TCA TTA	144
Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu	
35 40 45	
ACC GAC TTT GGT GTA AAC TGG GTT CGC CAG CCT CCA GGA AAG GGT CTG	192
Thr Asp Phe Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu	
50 55 60	
GAG TGG CTG GGA ATG ATA TGG ACT GAT GGA ATC ACA GAC TAT AAT TCA	240
Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Thr Asp Gly Ile Thr Asp Tyr Asn Ser	
65 70 75 80	
GTT CTC AAA TCC AGA CTG AGC ATC AGC AAG GAC ACC TCC AAG AGC CAA	288
Val Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln	
85 90 95	

GTT TTC TTG AAA ATG AAC AAT CTG CAA ACT GAT GAC ACA GCC AGG TAC 336
 Val Phe Leu Lys Met Asn Asn Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr
 100 105 110
 TAC TGT GCC AGA GAT GCA TAC TAC GGC TTC TAT GCT ATG GAC TAC TGG 384
 Tyr Cys Ala Arg Asp Ala Tyr Tyr Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
 115 120 125
 GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA 414
 Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 130 135

配列番号 : 8

配列の長さ : 138

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

起源

セルライン : 10.1

配 列

Met Ala Val Leu Ala Leu Leu Phe Cys Leu Val Thr Phe Pro Ser Cys

1

5

10

15

Ile Leu Ser Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala

20

25

30

Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu

35

40

45

Thr Asp Phe Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu

50

55

60

Glu Trp Leu Gly Met Ile Trp Thr Asp Gly Ile Thr Asp Tyr Asn Ser
 65 70 75 80
 Val Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln
 85 90 95
 Val Phe Leu Lys Met Asn Asn Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr
 100 105 110
 Tyr Cys Ala Arg Asp Ala Tyr Tyr Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
 115 120 125
 Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 130 135

配列番号 : 9

配列の長さ : 15

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

起源

セルライン : 1.4

配 列

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Ile Ser Phe Met His
 1 5 10 15

配列番号 : 10

配列の長さ : 7

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

起源

セルライン : 1.4

配 列

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser

1

5

配列番号 : 11

配列の長さ : 9

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

起源

セルライン : 1.4

配 列

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Phe Thr

1

5

配列番号 : 12

配列の長さ : 6

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

起源

セルライン : 1.4

配 列

Ser Asp Tyr Ala Trp Asn

1 5

配列番号 : 13

配列の長さ : 16

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

起源

セルライン : 1.4

配 列

Tyr Ile Arg Tyr Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

配列番号 : 14

配列の長さ : 9

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

起源

セルライン : 1.4

配 列

Asp Leu Asp Ala Trp Tyr Phe Asp Val

1 5

配列番号 : 15

配列の長さ : 11

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

起源

セルライン : 10.1

配 列

Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Thr Tyr Val Ser

1 5 10

配列番号 : 16

配列の長さ : 7

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

起源

セルライン : 10.1

配 列

Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr

1 5

配列番号 : 17

配列の長さ : 9

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

起源

セルライン : 10.1

配 列

Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr

1

5

配列番号 : 18

配列の長さ : 5

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

起源

セルライン : 10.1

配 列

Asp Phe Gly Val Asn

1

5

配列番号 : 19

配列の長さ : 16

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

起源

セルライン : 10.1

配 列

Met Ile Trp Thr Asp Gly Ile Thr Asp Tyr Asn Ser Val Leu Lys Ser

1

5

10

15

配列番号 : 20

配列の長さ : 11

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

起源

セルライン : 10.1

配 列

Asp Ala Tyr Tyr Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr

1

5

10

配列番号 : 21

配列の長さ : 22

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配 列

GGCACCTCCA GATGTAACT GC

22

配列番号 : 22

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配 列

GAARTAVCCC TTGACCAGGC

20

配列番号 : 23

配列の長さ : 48

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列の特徴

存在位置 : 36, 37, 41, 42, 46, 47

その他の特徴 : Nはイノシン(I)を表す。

配 列

CUACUACUAC UAGGCCACGC GTCGACTAGT ACGGGNNGGG NNGGGNNG

48

配列番号 : 24

配列の長さ : 46

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配 列

TATAGAGCTC AAGCTTGGAT GGTGGAAGA TGGATACAGT TGGTGC

46

配列番号 : 25

配列の長さ : 50

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配 列

TATAGAGCTC AAGCTTCCAG TGGATAGACH GATGGGGSTG TYGTTTTGGC 50

配列番号 : 26

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配 列

ACCGAGCTCG GATCCACTAG 20

配列番号 : 27

配列の長さ : 21

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配 列

ATGCATGCTC GAGCGGCCGC C 21

請求の範囲

1. ヒト由来II型ホスホリパーゼA2の活性を阻害し、かつサル由来II型ホスホリパーゼA2及び／またはマウス由来II型ホスホリパーゼA2の活性を阻害することができるモノクローナル抗体、またはその一部分を含み該阻害能を有するタンパク質。
2. 細胞膜に結合したII型ホスホリパーゼA2を遊離する作用を有するモノクローナル抗体、またはその一部分を含む該作用を有するタンパク質。
3. ホスホリパーゼA2がヒト由来である請求の範囲2記載のモノクローナル抗体またはタンパク質。
4. ヒト由来II型ホスホリパーゼA2の活性を阻害し、かつサル由来II型ホスホリパーゼA2及び／またはマウス由来II型ホスホリパーゼA2の活性を阻害することができ、かつ細胞膜に結合したII型ホスホリパーゼA2を遊離する作用を有するモノクローナル抗体、またはその一部分を含み該作用を有するタンパク質。
5. ハイブリドーマ12H5 (FERM BP-5300)、ハイブリドーマ1.4 (FERM BP-5297) またはハイブリドーマ10.1 (FERM BP-5298) のいずれかにより産生されるモノクローナル抗体もしくはその一部分を含むタンパク質、またはそれらと同等のII型ホスホリパーゼA2に対する作用を有するモノクローナル抗体もしくはその一部分を含むタンパク質。
6. 配列番号2、4、6または8のいずれかに示されるアミノ酸配列または該アミノ酸配列に含まれる1つまたは複数のアミノ酸に対しアミノ酸の置換、欠失または挿入を行ったアミノ酸配列を有するタンパク質を含む、請求の範囲1または2に記載のモノクローナル抗体、またはその一部分を含むタンパク質。
7. 配列番号9～20のいずれかに示されるアミノ酸配列または該アミノ酸配列に含まれる1つまたは複数のアミノ酸に対しアミノ酸の置換、欠失または挿入を行ったアミノ酸配列を有するタンパク質を含む、請求の範囲1または2に記載の

モノクローナル抗体、またはその一部分を含むタンパク質。

8. 請求の範囲1～7のいずれかに記載のモノクローナル抗体またはタンパク質を産生する細胞。

9. ハイブリドーマである請求の範囲8記載の細胞。

10. 組換えDNAによって形質転換された細胞である請求の範囲8記載の細胞。

11. 請求の範囲8記載の細胞を培養し、培養上清からモノクローナル抗体またはタンパク質を回収する工程を含む、請求の範囲1～7のいずれかに記載のモノクローナル抗体またはタンパク質を製造する方法。

12. 請求の範囲1～7のいずれかに記載のモノクローナル抗体またはタンパク質をコードするDNA。

13. 配列番号1、3、5または7のいずれかに示される塩基配列または該塩基配列に含まれる1つまたは複数の塩基に対し塩基の置換、欠失または挿入を行った塩基配列を含む、請求項12に記載のDNA。

14. 請求の範囲12または13のDNAを含む組換えベクター。

15. 請求の範囲1～7のいずれかに記載のモノクローナル抗体またはタンパク質と薬剤学的に許容される担体とからなる医薬組成物。

16. 請求の範囲1～7のいずれかに記載のモノクローナル抗体またはタンパク質を含むII型ホスホリパーゼA2阻害剤。

1

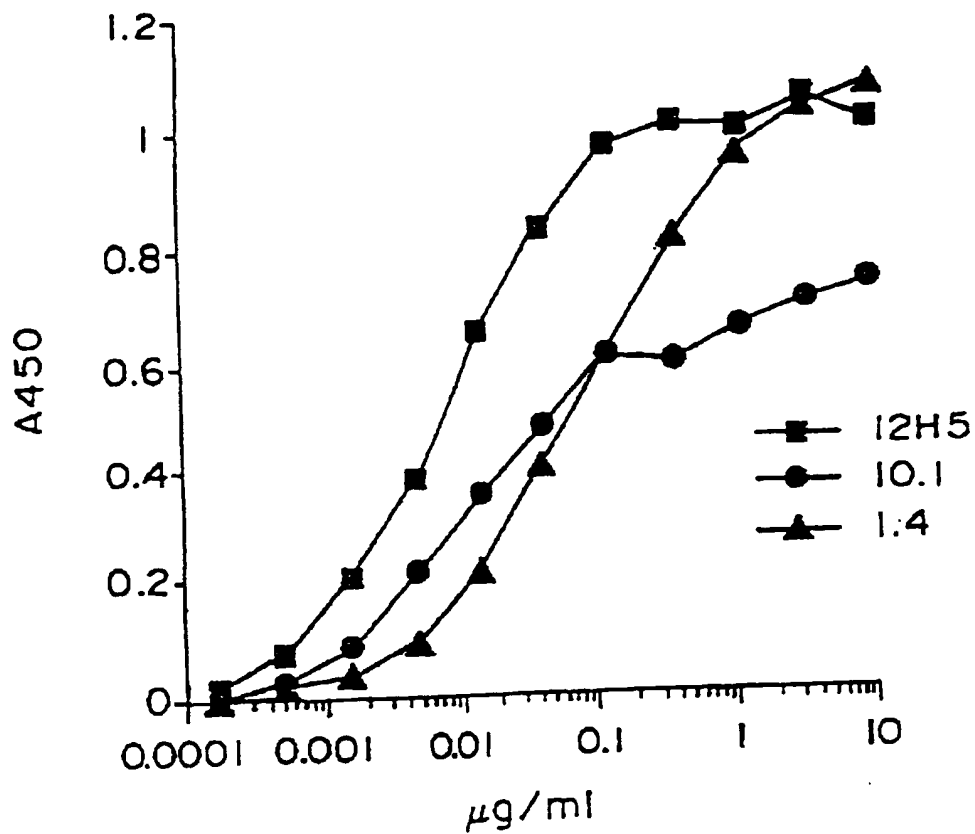


図 2

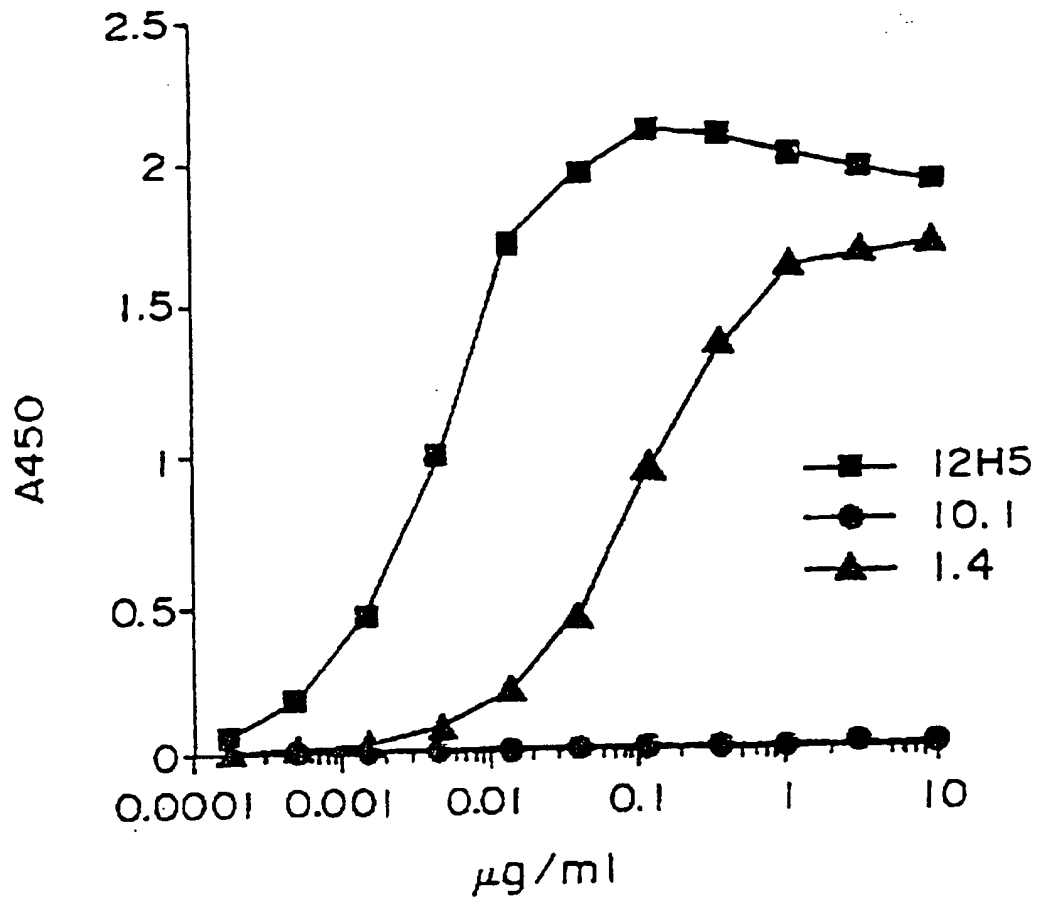


図 3

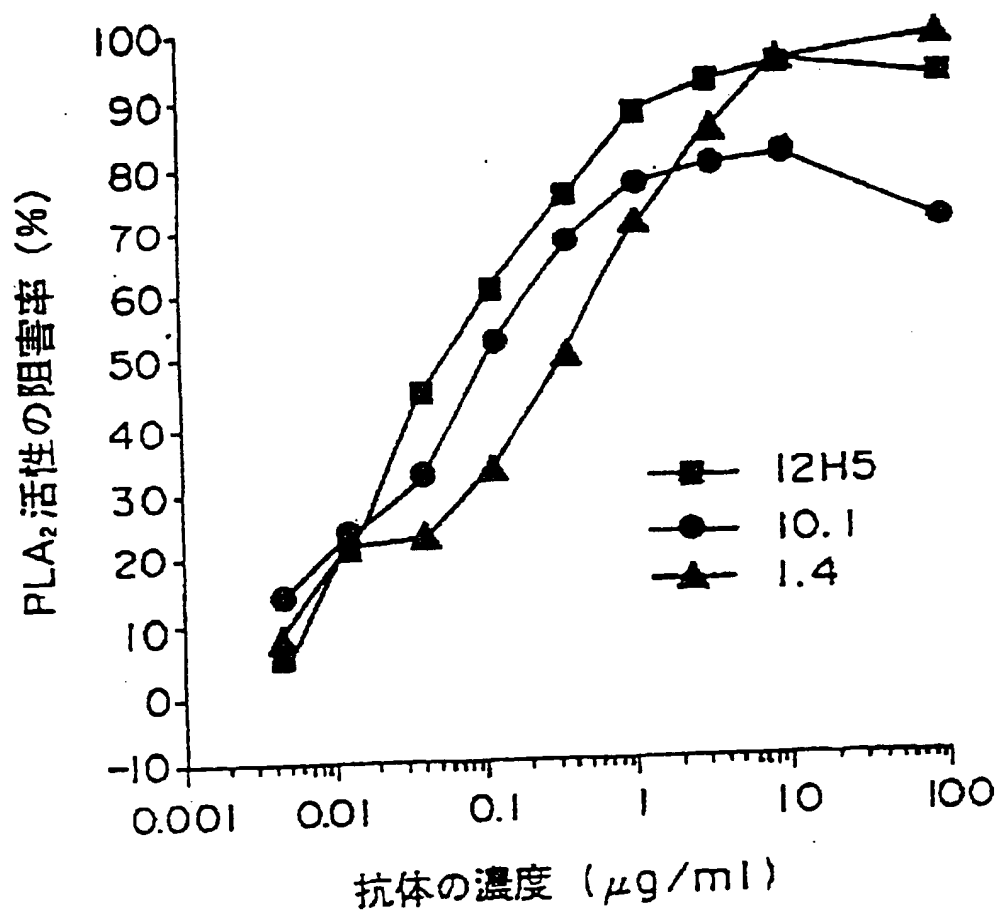


図 4

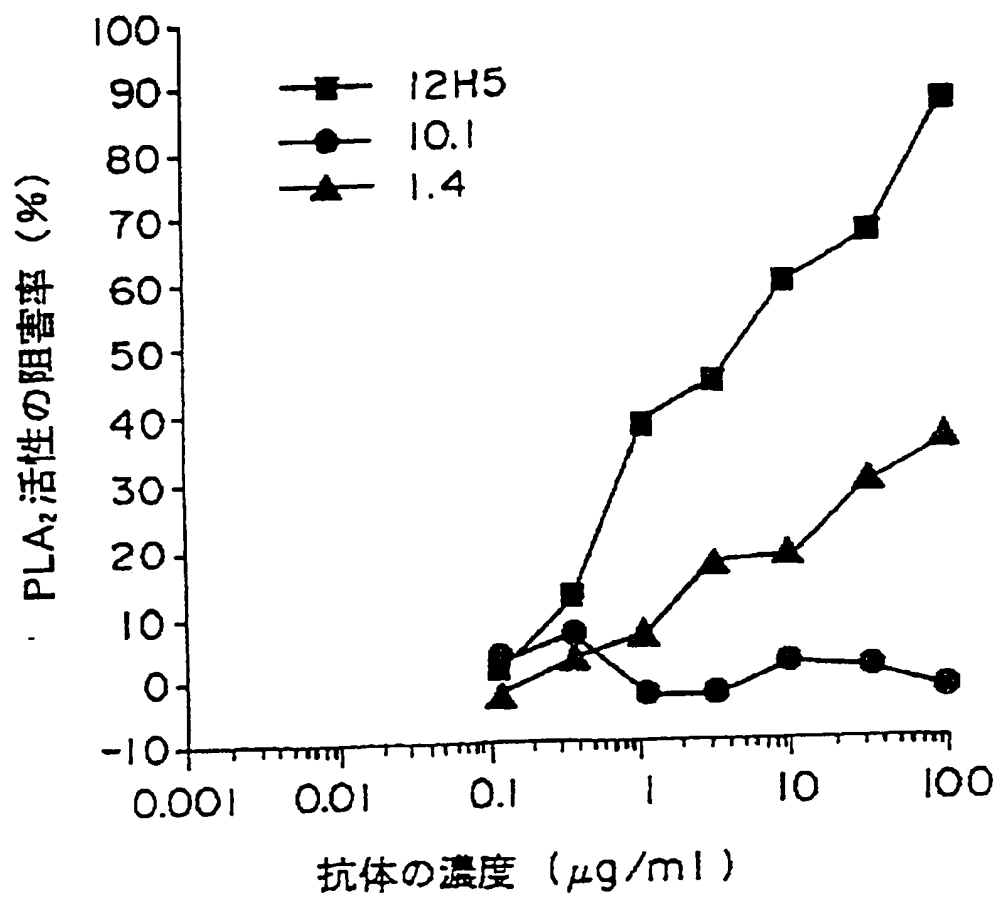


図 5

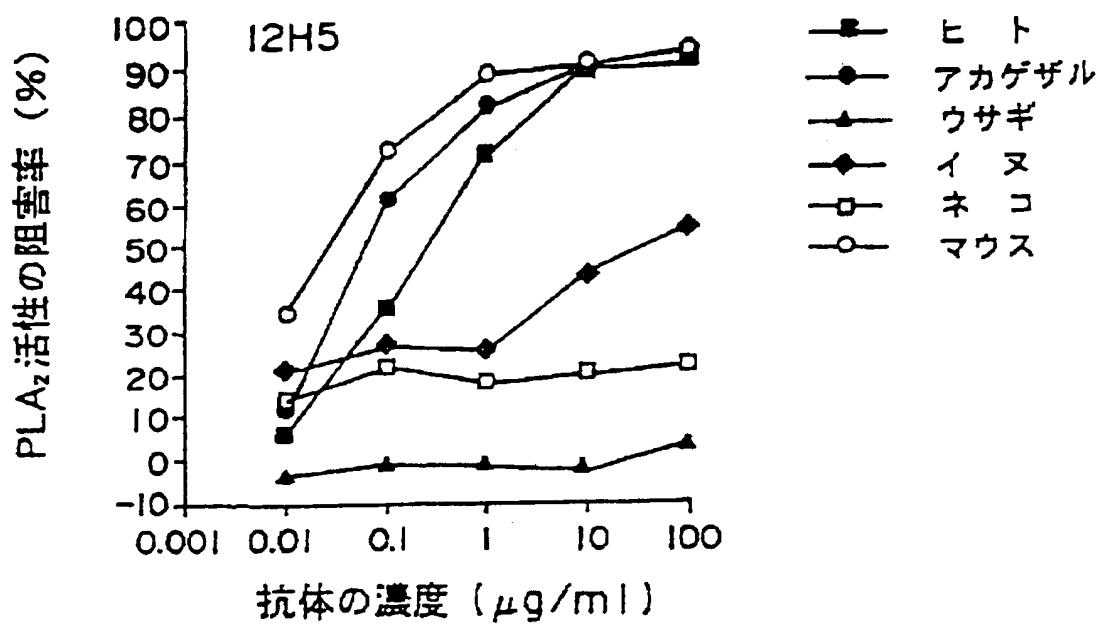


図 6

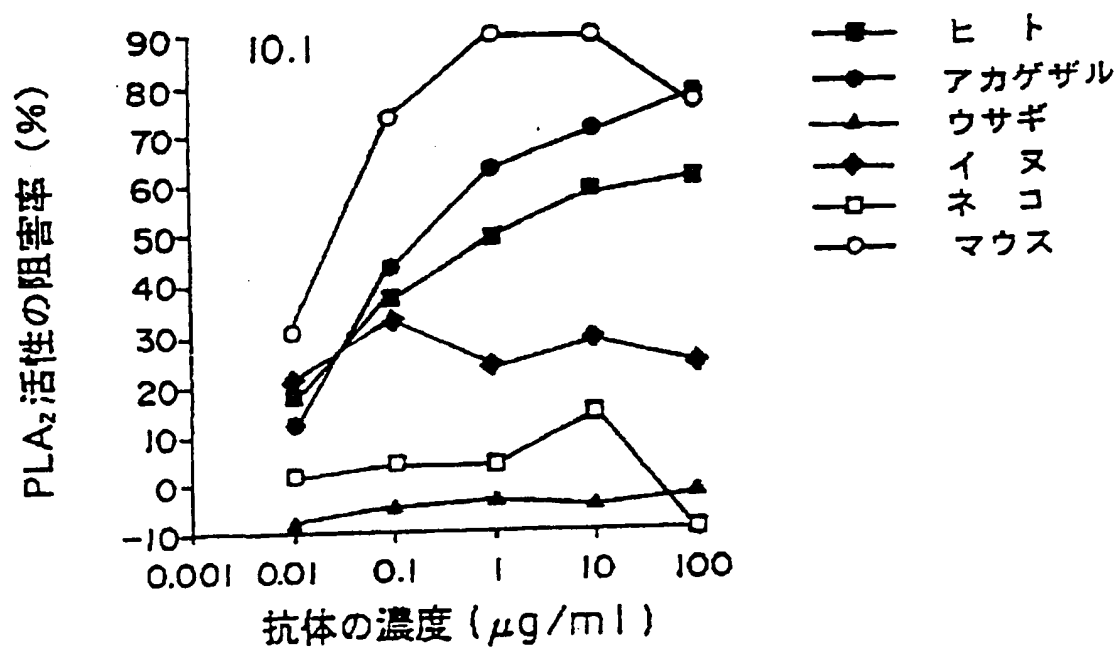


図 7

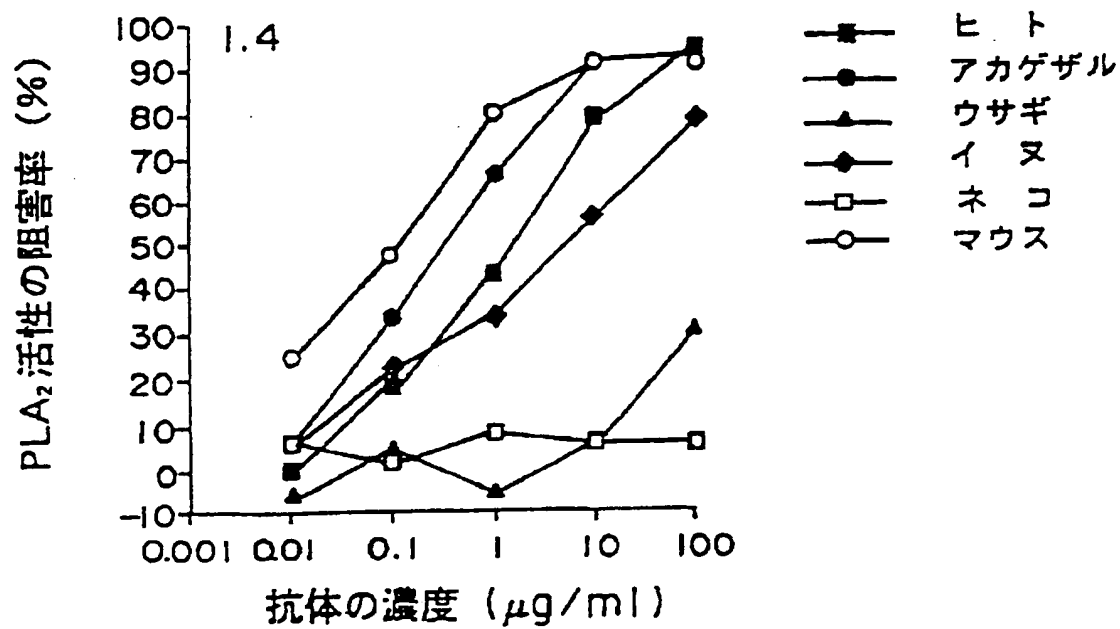
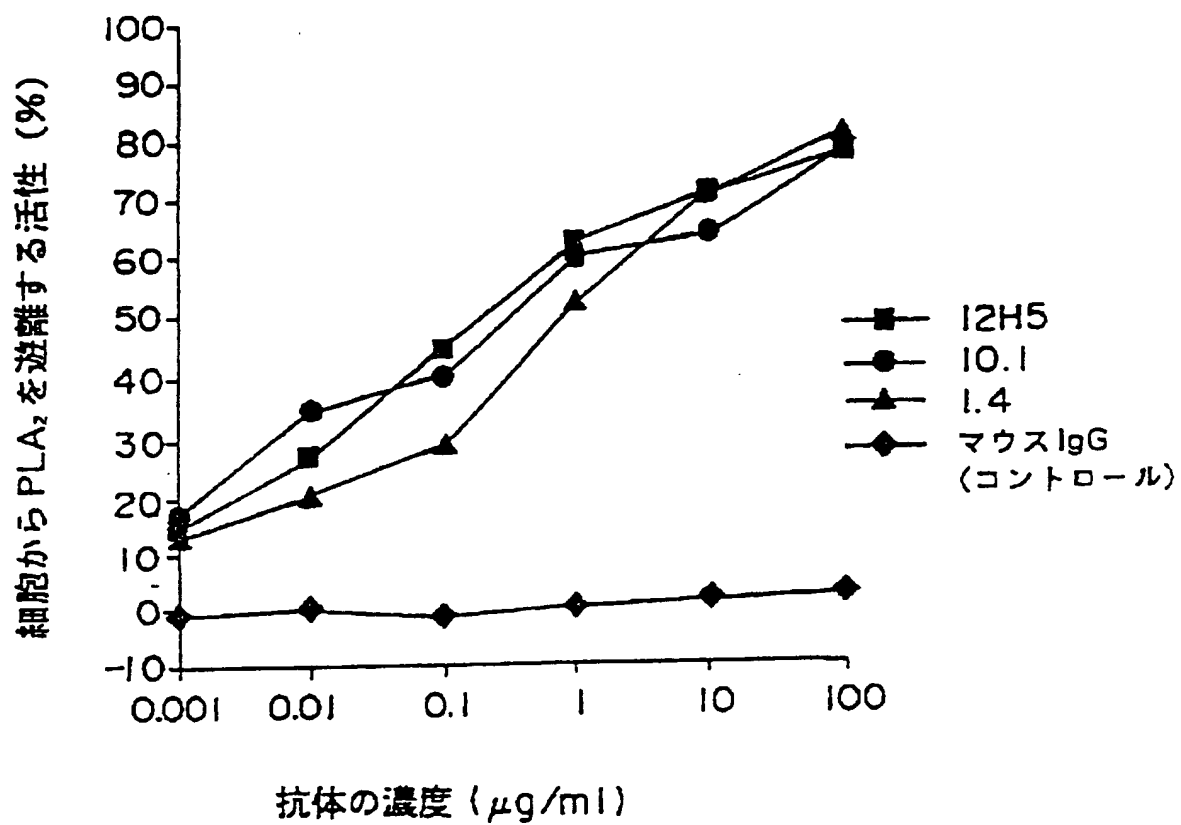


図 8



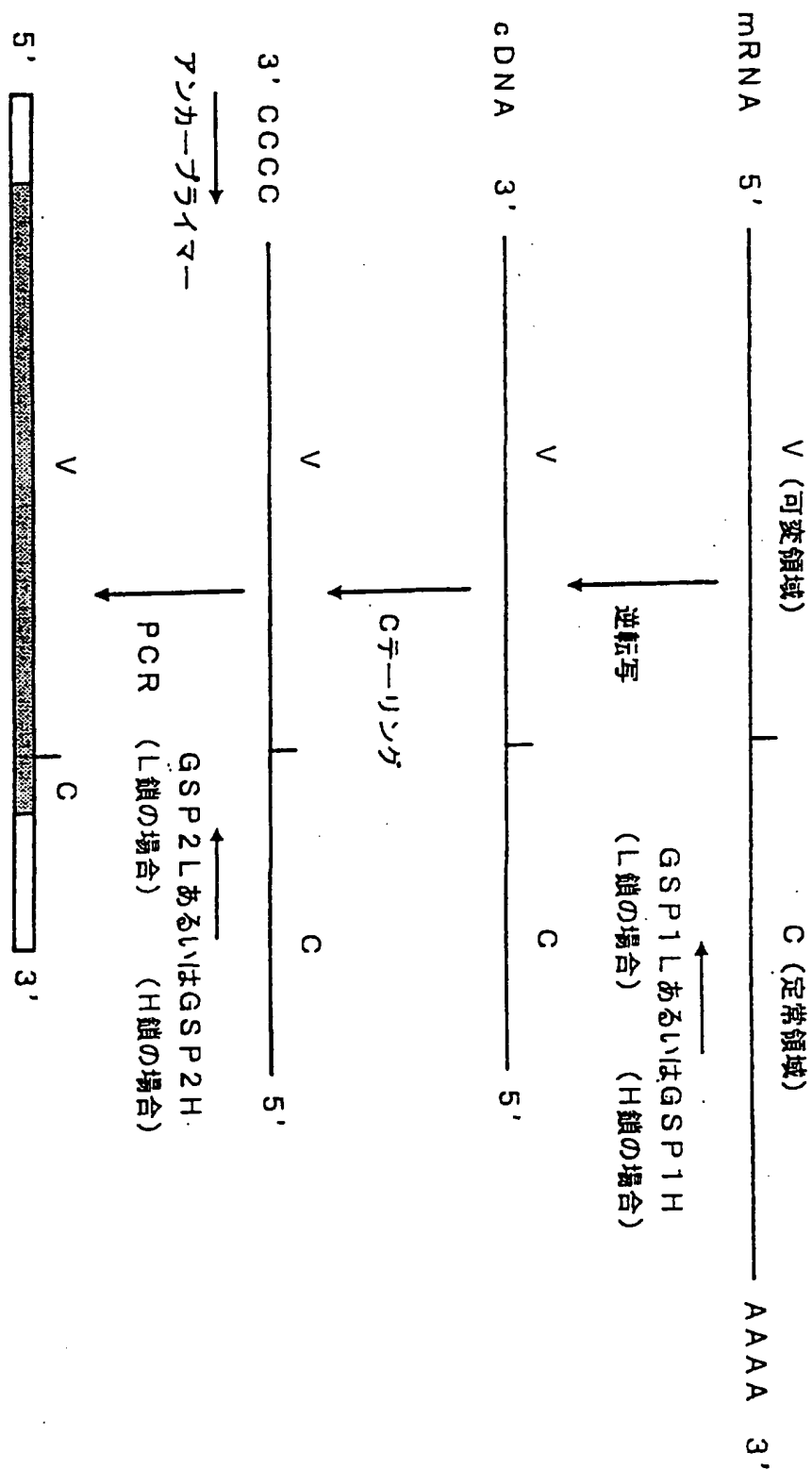


図 9

FIG 10

ATGGAGACAGACACACTCTGCTATGGGTGCTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTCCACAGGT 60
MetGluThrAspThrLeuLeuLeuTrpValLeuLeuLeuTrpValProGlySerThrGly

GACATTGTCCTGACCCAATCTCCAGCTTCCTTGGCTGTGTCTTTAGGGCAGAGGGCCACC 120
AspIleValLeuThrGlnSerProAlaSerLeuAlaValSerLeuGlyGlnArgAlaThr

ATATCCTGCAGAGCCAGTCAAAGTGTGTAGTTATGGCATTAGTTTTATGCACTGGTAT 180
IleSerCysArgAlaSerGlnSerValAspSerTyrGlyIleSerPheMetHisTrpTyr

CAGCAGAAACAGGACAGCCCCCAAACTCCTCATTTATGTGCATCCAACTAGAAATCT 240
GlnGlnLysProGlyGlnProProLysLeuLeuIleTyrArgAlaSerAsnLeuGluSer

GGGATCCCTGCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTAGGACAGAATTCACCCCTCACCATTAA 300
GlyIleProAlaArgPheSerGlySerGlySerArgThrGluPheThrLeuThrIleAsn

CCTGTGGAGGCTGATGATGTTCGAACTATCACTGTAGCAAAGTAATGAGGATCCATTC 360
ProValGluAlaAspAspValAlaThrTyrHisCysGlnGlnSerAsnGluAspProPhe

ACGTTGGCTGGGGACAAAGTGGAAATAAAA 393
ThrPheGlySerGlyThrLysLeuGluIleLys

111

ATGAGAGTGCAGATCTCTTTGGGCGCTTCACAGCCTTTCCTGGCTTCCTGCTCGATGTG 60
MetArgValLeuIleLeuLeuTrpLeuPheThrAlaPheProGlyPheLeuSerAspVal

CAGCTTCAGGAATCGGGAACCTGGCCTGGTGAAACCTTCTCAATCTCTGTCCCTCAACCTGC 120
GlnLeuGlnGlnSerGlyProGlyLeuValLysProSerGlnSerLeuSerLeuThrCys

ATGGTCACTGGCTACTCAATCAACAGTGATTATGCTGGAACTGGATCCGGCAGTTTCGG 180
MetValThrGlyTyrSerIleThrSerAspTyrAlaTrpAsnTrpIleArgGlnPhePro

GGAAACAAACTGGAGCGGATGGGATACATAAGGTACAGTGGTTACACTAGCTACAACCCA 240
GlyAsnLysLeuGlnArgMetGlyTyrIleArgTyrSerGlyTyrThrSerTyrAsnPro

TCTCTCAAAAGTGAATCTTTATCAAGCGACACACATCCAGAACCTTCTTCTCTACAT 300
SerLeuLysSerArgIlePheIleThrArgAspThrSerGlnAsnGlnPhePheLeuHis

TTGACTTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTACAAGAGACTTGGACGCC 360
LeuThrSerValThrThrGluAspThrAlaThrTyrTyrCysThrArgAspLeuAspAla

TGGTACTTCGATGTTTGGGGCGCAGGGACAACGGTCAACGCTCTCTCTCA 408
TrpTyrPheAspValTrpGlyAlaGlyThrThrValThrValSerSer

図 12

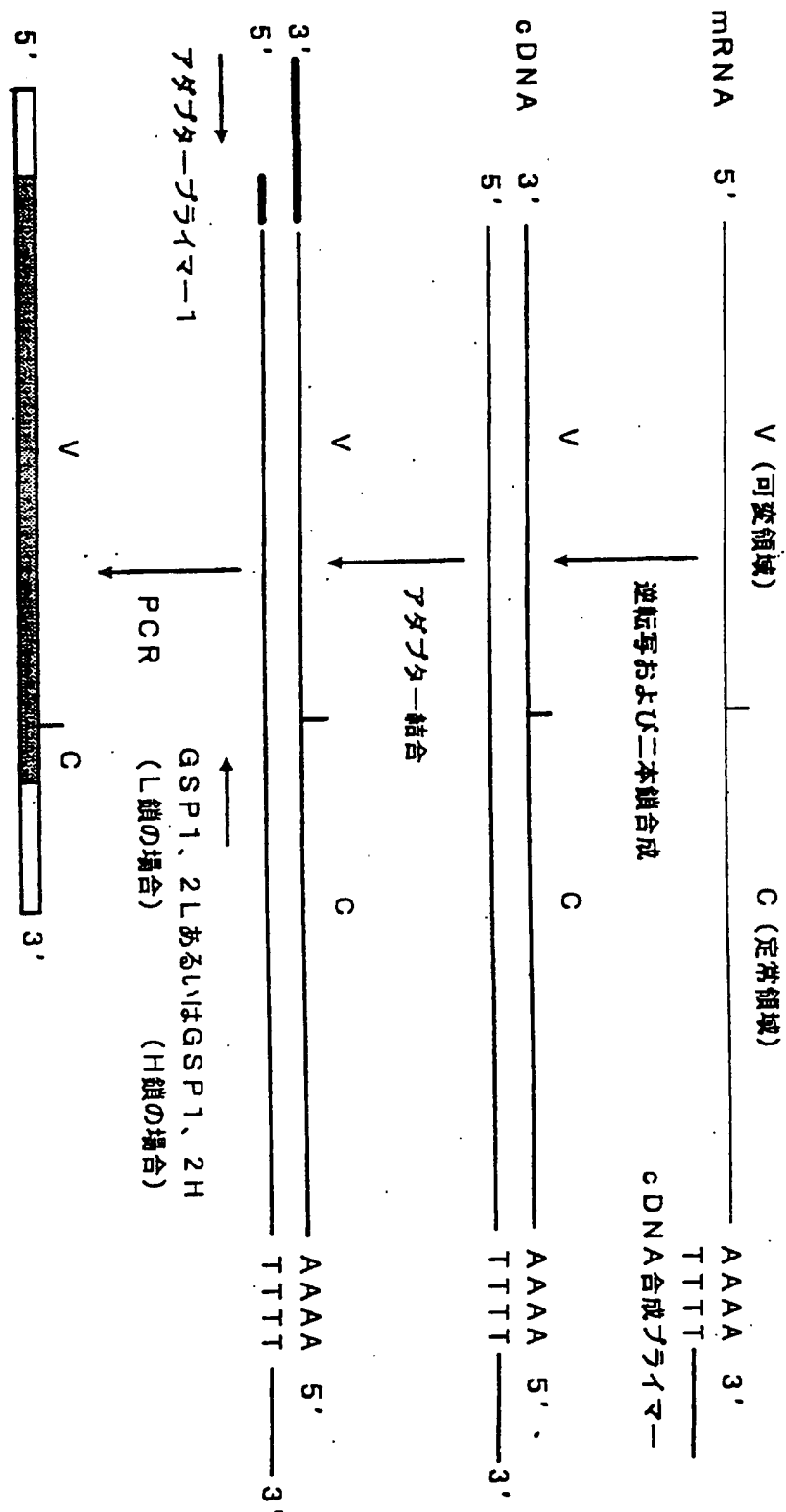


図 13

ATGGAATCAGACTCTGGTCTTCATATCCATACTGCTCTGGTTATATGGAGCTGATGGG 60
MetGluSerGlnThrLeuValPheIleSerIleLeuLeuTrpLeuTyrGlyAlaAspGly

AACATTGTAATGAOCCAATCTOCCAATCCATGTCCATGTCAGTAGGAGAGAGGGTCACC 120
AsnIleValMetThrGlnSerProLysSerMetSerMetSerValGlyGluArgValThr

TTGACCTGCAAGGOCAGTGAGAATGTGGTTACTTATGTTTCTGGTATCAACAGAAOCCA 180
LeuThrCysLysAlaSerGluAsnValValThrTyrValSerTrpTyrGlnGlnLysPro

GAGCAGTCTOCTAAACTGCTGATATAOGGGGCATCCAACGGTACACTGGGGTCCCCGAT 240
GluGlnSerProLysLeuLeuIleTyrGlyAlaSerAsnArgTyrThrGlyValProAsp

CGCTTCACAGGCAGTGGATCTGCAACAGATTTCCTCTGACCATCAGCAGTGTGCAGGCT 300
ArgPheThrGlySerGlySerAlaThrAspPheThrLeuThrIleSerSerValGlnAla

GAAGACCTGCAGATTATCACTGTGGACAGGGTTACAGCTATOOGTACAGTTGCGAGGG 360
GluAspLeuAlaAspTyrHisCysGlyGlnGlyTyrSerTyrProTyrThrPheGlyGly

GGGACCAAGCTGGAAATAAAA 381
GlyThrLysLeuGluIleLys

14

ATGGCTGTCTGGCATTACTTTTGTGCTGGTAAACATTCCTCAAGCTGTATCTTTTCCAG 60
MetAlaValLeuAlaLeuLeuPheCysLeuValThrPheProSerCysIleLeuSerGln

GTGCAGCTGAAGGAGTCAGGAOCTGGCTGGTGGGCOCTCACAGAGCTGTCCATCACA 120
ValGlnLeuLysGluSerGlyProGlyLeuValAlaProSerGlnSerLeuSerIleThr

TGTACCGTCTCAGGGTCTCATTAAOCTGCTTGGTGTAACTGGGTTCTGOCAGCTCCA 180
CysThrValSerGlyPheSerLeuThrAspPheGlyValAsnTrpValArgGlnProPro

GGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAATGATATGGACTGATGGAATCACAGACTATAATTCA 240
GlyLysGlyLeuGluTrpLeuGlyMetIleTrpThrAspGlyIleThrAspTyrAsnSer

GTCTCAAATCCAGACTGAGCATCAGCAAGGACCTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTGAAA 300
ValLeuLysSerArgLeuSerIleSerLysAspThrSerLysSerGlnValPheLeuLys

ATGAACAATCTGCAAACTGATGACACAGCCAGGTACTACTGTGOCAGAGATGCATACTAC 360
MetAsnAsnLeuGlnThrAspAspThrAlaArgTyrTyrCysAlaArgAspAlaTyrTyr

GGCTTCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCTCTCA 414
GlyPheTyrAlaMetAspTyrTrpGlyGlnGlyThrSerValThrValSerSer

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP95/02714

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C07K16/40, C07K16/18, C12P21/08, C21N15/06, C12N15/13, C12N5/20, C12N9/99, A61K39/395// (C12P21/08, C12R1:91)
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12P21/00, C12P21/02, C12P21/08, C12N15/02-15/90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS PREVIEWS, WPI, WPI/L, CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 63-258898, A (Shinogi & Co., Ltd.), October 26, 1988 (26. 10. 88) & EP, 287397, A & US, 4978609, A	1 - 16
A	JP, 4-36193, A (Shinogi & Co., Ltd.), February 6, 1992 (06. 02. 92) & EP, 459450, A & US, 5358849, A	1 - 16
A	JP, 7-109300, A (Teijin Ltd.), April 25, 1995 (24. 04. 95) (Family: none)	1 - 16
A	Takayama, K. et al. "Monoclonal antibodies against human synovial phospholipase A2", Biochem. Biophys. Res. Commun. (1990) Vol. 167, No. 3, p. 1309-1315	1 - 16
A	Storner, C.R. et al. "Human group II phospholipase A2 characterization of monoclonal antibodies and immunochemical quantitation of the protein in synovial fluid", J. Immunol. Methods (1991) Vol. 145, Nos 1 to 2, p. 127-136	1 - 16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

April 1, 1996 (01. 04. 96)

Date of mailing of the international search report

April 16, 1996 (16. 04. 96)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP95/02714

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Misaki, A. et al. "Production and characterization of monoclonal antibodies against human pancreatic phospholipase A2", J. Clin. Biochem. Nutr. (1991) Vol. 11, No. 2 p. 79-90	1 - 16
A	Murakami, M. et al. "Preparation of antibodies to phospholipase A2", Methods Enzymol. (1991) Vol. 197, p. 223-233	1 - 16

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C07K 16/40, C07K 16/18, C12P 21/08, C12N 15/06, C12N 15/13, C12N 5/20, C12N 9/99, A61K 39/395
// (C12P 21/08, C12R 1:91)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12P 21/00, C12P 21/02, C12P 21/08, C12N 15/02-15/90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS PREVIEWS, WPI, WPI/L, CAS ONLINE

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 63-258898, A (塩野義製薬株式会社) 26.10月.1988 (26.10.88) &EP, 287397, A &US, 4978609, A	1-16
A	JP, 4-36193, A (塩野義製薬株式会社) 6.2月.1992 (06.02.92) &EP, 459450, A &US, 5358849, A	1-16
A	JP, 7-109300, A (帝人株式会社) 25.4月.1995 (24.04.95) (ファミリーなし)	1-16

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01.04.96

国際調査報告の発送日

16.04.96

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

佐伯 裕子

4B

9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Takayama, K. et al. "Monoclonal antibodies against human synovial phospholipase A2", Biochem. Biophys. Res. Commun. (1990) 第167巻, 第3号, p. 1309-1315	1-16
A	Storner, C. R. et al. "Human group II phospholipase A2 characterization of monoclonal antibodies and immunochemical quantitation of the protein in synovial fluid", J. Immunol. Methods (1991) 第145巻, 第1-2号, p. 127-136	1-16
A	Misaki, A. et al. "Production and characterization of monoclonal antibodies against human pancreatic phospholipase A2", J. Clin. Biochem. Nutr. (1991) 第11巻, 第2号, p. 79-90	1-16
A	Murakami, M. et al. "Preparation of antibodies to phospholipase A2", Methods Enzymol. (1991) 第197巻, p. 223-233	1-16